

**Neurale Progenitoren – *in vitro* Untersuchungen und
Charakterisierungen der Proliferation und Differenzierung
zu dopaminergen Neuronen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Corinna Mauth
aus Staßfurt

1. Referent: Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer

2. Referent: Prof. Dr. Augustinus Bader

eingereicht am: 29.01.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.04.2004

Druckjahr 2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Mauth C, Just L, Bader A. (2001). Neurale Progenitoren - Untersuchungen zur Proliferation und Zelldifferenzierung. (Vortrag) 2. Tissue Engineering Marathon, Frankfurt am Main.

Mauth C, Pruszk J, Nikkhah G, Just L, Bader A. (2001). Influence of different culture conditions on the proliferation of precursors obtained from ventral mesencephalon of embryonic rats. (Poster) Second Transdisciplinary Conference on Principles and Perspectives in Regenerative Medicine, Hannover.

Mauth C, Just L, Bader A. (2001). Neural progenitor cells - *In vitro* investigation of proliferation and differentiation. (Vortrag) 1st Biennial Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), 4th International Meeting of the Tissue Engineering Society International (TESi), Freiburg im Breisgau. Abstract in: *Tissue Engineering*, 7(5):614.

Mauth C, Just L, Bader A. (2002). Neural progenitor cells - An investigation of proliferation and differentiation *in vitro*. (Vortrag) XXIX. Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO), Wien. Abstract in: *Int J Artif Organs* 25(7):690.

Mauth C, Just L, Bader A. (2003). *In vitro* differentiation of neuronal progenitor cells on a bioFoil membrane system. (Poster) 29th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen.

Mauth C, Wiehle M, Schulz R, Stahl F, Bader A. and Just L. (2003) Proliferation and differentiation of neural precursors prepared from ventral mesencephalon of embryonic rats. (Poster) Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, Prag.

Mauth C, Just L, Bader A. (2003) Influence of oxygen on the *in vitro* differentiation of neural precursors from the ventral mesencephalon using a bioFoil-membrane-system. (Vortrag) I. Congress on regenerative medicine, Leipzig.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2001 bis Dezember 2003 in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer danke ich sehr für seine Unterstützung bei der Erlangung der Promotionszulassung und der Bereitschaft als Mentor meine Doktorarbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Augustinus Bader danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation in der Nachwuchsforschergruppe Organ- und Gewebekulturtechnik anfertigen zu dürfen, und für die interessante Themenstellung.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Lothar Just für seine hervorragende Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. Kurt Dittmar gilt mein Dank für seine Unterstützung nach dem Umzug der Arbeitsgruppe sowie für seine Freundlichkeit und seine Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen.

Der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe Organ- und Gewebekulturtechnik danke ich für das gute Arbeitsklima und wünsche Ihnen viel Erfolg in Leipzig. Dabei danke ich Andrea Deiwick für ihre ständige Hilfsbereitschaft. Susann Loose und Frank Stahl danke ich für die Unterstützung bei den Mikroarray-Untersuchungen. Michael Wiehle danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Anja Steffen danke ich besonders für die Durchsicht der Arbeit und ihre Freundlichkeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik danke ich, dass ich immer willkommen war und für die vielen schönen Momente während meiner gesamten GBF-Zeit.

Der GBF dank ich für die guten Arbeitsbedingungen und die freundliche Unterstützung, besonders nach dem Auszug der Arbeitsgruppe.

Oussama danke ich dafür, dass er *immer* für mich da war.

*Wenn das Gehirn des Menschen so einfach wäre, dass wir es verstehen könnten, dann
wären wir so dumm, dass wir es doch nicht verstehen würden.*

Jostein Gaarder

*Meiner Familie,
und in Gedenken an meine Uroma*

Inhaltverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1.	ANATOMIE DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS (ZNS).....	1
1.1.1.	Die Entwicklung des ZNS.....	1
1.1.2.	Das Nervensystem	3
1.1.2.1.	Aufbau der Astrozyten.....	4
1.1.2.2.	Aufbau der Neurone	4
1.1.3.	Dopamin und das dopaminerge System	6
1.1.3.1.	Dopaminsynthese und Abbau	6
1.2.	STOFFWECHSEL DES GEHIRNS	8
1.2.1.	Stoffwechsel zwischen Neuronen und Gliazellen	9
1.3.	MORBUS PARKINSON	11
1.3.1.	Pathologie.....	11
1.3.2.	Pathogenese.....	12
1.3.2.1.	Oxidativer Stress.....	12
1.3.2.2.	Oxidativer Stress durch die Bildung freier Radikale	13
1.3.2.3.	Antioxidative Mechanismen	15
1.3.2.4.	Apoptose und Nekrose.....	15
1.3.3.	Therapieansätze zur Behandlung des Morbus Parkinson	18
1.3.3.1.	Pharmakotherapie	18
1.3.3.2.	Chirurgische Therapieansätze	19
1.4.	KULTIVIERUNG NEURALER PROGENITOR- BZW. STAMMZELLEN	22
1.5.	AUFGABENSTELLUNG.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1.	MATERIAL.....	26
2.1.1.	Labora Ausstattung	26
2.1.2.	Chemikalien	27
2.1.3.	Medien und Zusätze	28
2.1.4.	Enzyme.....	29
2.1.5.	Antikörper	29
2.1.6.	Analyse Kits	29
2.1.7.	Verbrauchsmaterialien	29

2.2.	ZELLKULTUR	30
2.2.1.	Nährmedien und Medienzusätze.....	30
2.2.1.1.	Nährmedien zur Kultivierung von Zelllinien.....	30
2.2.1.2.	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.1.3.	Nährmedien zur Kultivierung von primären Zellkulturen	31
2.2.1.4.	Nährmedienzusätze.....	32
2.2.2.	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	33
2.2.2.1.	Kultivierung und Subkultivierung einer GOS-3-Zelllinie	33
2.2.2.2.	Kultivierung und Subkultivierung der PC-12-Zelllinie	34
2.2.2.3.	Revitalisierung der Zelllinien	34
2.2.2.4.	Kryopräservierung der Zelllinien.....	34
2.2.2.5.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	35
2.2.2.6.	Kryopräservierung von <i>Escherichia coli</i>	35
2.2.3.	Kultivierung primärer Zellen.....	35
2.2.3.1.	Isolation embryonaler neuraler Progenitoren.....	35
2.2.3.2.	Kultivierung embryonaler neuraler Progenitoren	36
2.2.4.	Kultivierungsbedingungen	37
2.2.5.	Beschichtungen der Zellkulturoberflächen.....	38
2.2.6.	Das bioFolie-Membransystem.....	39
2.3.	ANALYTIK	42
2.3.1.	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität	42
2.3.2.	Analyse der Glukose- Laktatkonzentrationen	42
2.3.3.	Quantifizierung der Katecholamine	42
2.3.3.1.	Extraktion der Katecholamine	42
2.3.3.2.	HPLC-System mit elektrochemischer Detektion zur Quantifizierung der extrahierten Katecholamine	43
2.3.3.3.	Auswertung der gemessenen Daten des HPLC-Systems	44
2.4.	IMMUNZYTOCHEMISCHE MARKIERUNG	45
2.4.1.	Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Assay	45
2.4.2.	Immunzytochemische Markierung spezifischer neuraler Zelltypen	45
2.4.3.	Immunzytochemische Markierung apoptotischer Zellen	47
2.4.4.	Doppelmarkierungen	48
2.4.5.	Auswertung immunzytochemischer Markierungen.....	48
2.5.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	49
2.5.1.	RNA-Isolation mittels RNeasy MiniPräp Kit	49
2.5.2.	RNA-Isolation mittels Trizol-Aufreinigung	50
2.5.3.	Quantifizierung der isolierten RNA/DNA.....	51
2.5.4.	DNase-Verdau	51
2.5.5.	Reverse Transkription (RT).....	52
2.5.6.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	53
2.5.7.	Analytische Agarosegelelektrophorese.....	55

2.6.	QUANTITATIVE <i>REAL TIME</i> PCR.....	55
2.6.1.	Das Prinzip der <i>Real Time</i> PCR.....	55
2.6.2.	Quantifizierung und Identifizierung des PCR-Produkts.....	56
2.6.3.	Schmelzkurvenanalyse.....	57
2.6.4.	PCR Ansatz für die quantitative <i>Real Time</i> PCR.....	58
2.6.5.	Herstellung des DNA-Standards für die <i>Real Time</i> PCR.....	59
2.6.5.1.	Klonierung des DNA-Fragments	59
2.6.5.2.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	60
2.6.5.3.	Isolierung der Plasmid-DNA durch Minipräparation	61
2.6.5.4.	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	61
2.6.5.5.	Sequenzierung der Plasmid-DNA mit integriertem cDNA-Fragment	61
2.7.	STATISTISCHE ANALYSE	62
3	ERGEBNISSE.....	63
3.1.	DAS BIOFOLIE-MEMBRANSYSTEM.....	64
3.1.1.	Charakterisierung der Stoffwechselleistung von GOS-3-Zellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	64
3.1.1.1.	Zellwachstum.....	64
3.1.1.2.	Glukose- und Laktatkonzentration.....	67
3.1.1.3.	Immunzytochemische Analyse der GFAP-Expression.....	69
3.1.2.	Charakterisierung der Stoffwechselleistung von PC-12-Zellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	70
3.1.2.1.	Zellzahlbestimmung	70
3.1.2.2.	Glukose- und Laktatkonzentration.....	72
3.1.2.3.	Expressionsanalyse des Markergens Tyrosin-Hydroxylase.....	74
3.1.2.4.	Dopaminkonzentration im Medienüberstand.....	77
3.1.2.5.	Immunzytochemische Analyse der TH-Expression.....	78
3.1.2.6.	Untersuchungen zur Apoptose in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	79
3.2.	CHARAKTERISIERUNG NEURALER PROGENITOREN DES VENTRALEN MESEN- ZEPHALONS DER EMBRYONALEN RATTE	82
3.2.1.	Isolation und Proliferation neuraler Progenitoren.....	82
3.2.2.	Differenzierung neuraler Progenitoren.....	86
3.2.2.1.	Immunzytochemische Analysen	87
3.2.2.2.	Expressionsanalyse der Markergene.....	92
3.3.	CHARAKTERISIERUNG DER STOFFWECHSELLEISTUNG NEURALER PROGENIOREN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SAUERSTOFFKONZENTRATION	94
3.3.1.	Glukose- und Laktatkonzentration	94
3.3.1.1.	Glukose- und Laktatkonzentrationen ohne Antioxidantium	95
3.3.1.2.	Glukose- und Laktatkonzentration mit Ascorbinsäure	97
3.3.2.	Expressionsanalyse des Markergens Tyrosin-Hydroxylase.....	99
3.3.3.	Dopaminkonzentration im Medienüberstand.....	100
3.3.4.	Sauerstoffeinfluss auf die Differenzierung neuronaler Zellen.....	102
3.3.5.	Sauerstoffeinfluss auf die Differenzierung dopaminergere Neurone	104

3.3.6.	Vergleich des Sauerstoffeinflusses auf die Differenzierung dopaminерger Neurone .	107
4	DISKUSSION.....	110
4.1.	<i>IN VITRO</i> PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG EMBRYONALER NEURALER PROGENITOREN.....	112
4.1.1.	Proliferation.....	112
4.1.2.	Differenzierung.....	113
4.2.	<i>IN VITRO</i> DIFFERENZIERUNG NEURALER PROGENITOREN UNTER DEM EINFLUSS VON SAUERSTOFF	117
4.2.1.	Analyse des Energiestoffwechsels unter dem Einfluss von Sauerstoff.....	117
4.2.2.	Analyse der TH-Genexpression sowie der Dopaminsekretion unter dem Einfluss von Sauerstoff.....	120
4.2.3.	Analyse apoptotischer neuraler Zellen unter dem Einfluss von Sauerstoff.....	122
4.2.4.	<i>In vitro</i> Differenzierung dopaminерger Neurone unter dem Einfluss von Sauerstoff und Ascorbinsäure	124
5	ZUSAMMENFASSUNG	127
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	129
7	ANHANG.....	146
7.1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	146

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit stand die Thematik der *in vitro* Proliferation und Differenzierung embryonaler neuraler Progenitoren (Vorläuferzellen) zu dopaminergen Neuronen im Vordergrund. Die Untersuchungen sind im Zusammenhang mit der neurodegenerativen Parkinson-Erkrankung zu sehen, die durch eine selektive Degeneration der Dopaminneurone und dem einhergehenden Mangel des Neurotransmitters Dopamin hervorgerufen wird. Dabei birgt die Zellkulturtechnik primärer neuraler Progenitoren, neben zahlreichen Forschungsansätzen für die Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten, ein hohes Potential in sich.

Eingehend wird in den folgenden Abschnitten die grundlegende Anatomie des Nervensystems und dessen Stoffwechselaktivitäten beschrieben. Weiterführend wird das Krankheitsbild des Morbus Parkinson mit den derzeitigen bestehenden Therapiemöglichkeiten dargestellt. Dabei soll die Zelltransplantationstherapie und die Notwendigkeit der Forschung auf dem Gebiet der Zellkulturtechnik neuraler Stammzellen hervorgehoben werden.

1.1. Anatomie des zentralen Nervensystems (ZNS)

Das ZNS ist das zentrale Organ aller geistigen Funktionen, in dem Informationen gespeichert und weiterverarbeitet werden können. [Für die folgenden Abschnitte wurden zusätzliche Quellen verwendet: Junqueira *et al.*, 1996; Kandel *et al.*, 1996; Koolman und Röhm, 1998; Linne-
mann und Kühl, 2002; Berg *et al.*, 2003]

1.1.1. Die Entwicklung des ZNS

In der Entwicklung des Nervensystems ist das Neuralrohr stets der Ausgangspunkt. In dem sich anschließenden Drei-Blasen-Stadium liegen die Regionen des Vorderhirns, Mittelhirns, Rautenhirns sowie des Rückenmarks vor (Abb. 1.1. A links). Durch die Ausbildung einer Krümmung (Scheitelbeuge) zwischen Mittelhirn und Rautenhirn (Abb. 1.1. A rechts) kommt es zur Organisation zweier Hauptachsen – eine längsverlaufende Achse in „Kopf-Schwanz-Richtung“ (rostrocaudale Achse) sowie eine senkrecht dazu verlaufende Achse in „Rücken-Bauch-Richtung“ (dorsoventrale Achse).

Nach vollständiger Entwicklung der benannten Regionen bilden sich die im Folgenden beschriebenen Strukturen aus (Abb. 1.1. B). Aus dem Vorderhirn entwickelt sich sowohl das Telencephalon (Endhirn), als auch das Diencephalon (Zwischenhirn). Aus dem Rautenhirn werden die Strukturen der Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark), der Pons (Brücke) sowie das Cerebellum (Kleinhirn) abgeleitet. Hingegen bleibt das Mesenzephalon (Mittelhirn) während der Entwicklung bestehen und soll in der vorliegenden Arbeit fokussiert werden. Das Mesenzephalon stellt die kleinste Einheit im Hirnstamm dar und spielt dennoch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle motorischer Bewegungen sowie bei der Weiterleitung auditorischer und visueller Signale.

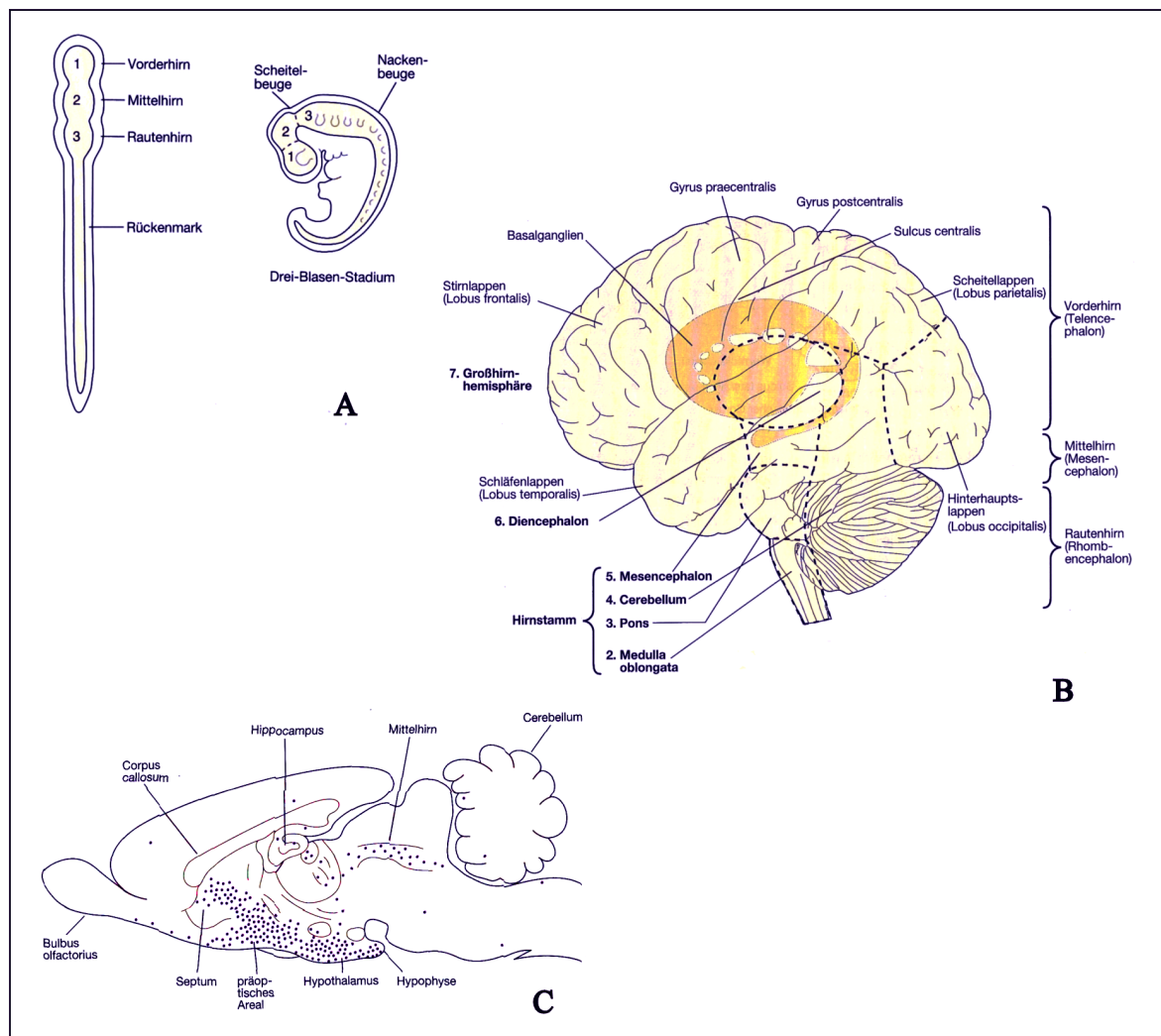


Abb. 1.1. Darstellung der **Entwicklung des Nervensystems** beim Menschen aus dem Neuralrohr (A, links), welches aus den Bereichen des Vorderhirns, Mittelhirns, Rautenhirns und dem caudalen Teil des Neuralrohrs (Rückenmark) besteht. Im weiteren Verlauf geht die Entwicklung in ein Drei-Blasen-Stadium über, wobei sich die Scheitelbeuge (A, rechts) durch eine Krümmung zwischen Mittelhirn und Rautenhirn bildet. Einzelne Strukturen des ZNS (B) bestehen aus Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark), Pons, Cerebellum, Mesenzephalon, Diencephalon und Telencephalon. (C) Darstellung eines Sagittalschnitts des Rattenhirns. [Kandel *et al.*, 1996; (A) Seite 80; (B) Seite 11 (modifiziert); (C) Seite 599].

1.1.2. Das Nervensystem

Das zentrale Nervensystem besteht wie jedes Gewebe aus verschiedenen Zelltypen sowie den Interzellulärsubstanzen. Nervengewebe kommt in fast allen Körperteilen vor, hat die Funktion Signale schnell zu übermitteln und ist an der Regulation, Koordination und Kontrolle aller Körpervorgänge beteiligt. Dabei besteht das gesamte System aus dem Zentralnervensystem (ZNS) (Gehirn und Rückenmark) sowie dem peripheren Nervensystem (PNS), welche anatomisch getrennt sind. Jedoch stehen sie in funktioneller Wechselwirkung miteinander. Das Hirngewebe ist stets durch eine Blut-Hirn-Schranke vom restlichen Körper getrennt, welche für einen selektiven Stofftransport sorgt.

Das Nervengewebe setzt sich aus zwei Zelltypen, den Nerven- und Gliazellen zusammen. Das menschliche Gehirn besitzt rund 25 Milliarden Nervenzellen unter denen die Gliazellen in großer Zellzahl im ZNS vorkommen. Sie stellen eine verbundene Einheit dar, in der die Nervenzellen die Funktion der Erregungsbildung sowie deren Weiterleitung und Verarbeitung übernehmen. Auch die Stoffbildung, der Stofftransport und die Stoffabgabe sind eng mit diesen Vorgängen verbunden.

Gliazellen lassen sich unterscheiden in Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten sowie Ependymzellen, wobei jeder Zelltyp spezifische Funktionen übernimmt. So stellen die Astrozyten die Leitstrukturen bei der Gehirnentwicklung dar, bilden Narben bei Verletzungen des ZNS, tragen dazu bei, das Ionenmilieu konstant zu halten und sind an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke sowie an Immunabwehrreaktionen beteiligt. Außerdem haben sie eine metabolische Funktion, da sie den Neuronen Metabolite zur Verfügung stellen, worauf später näher eingegangen wird.

Oligodendrozyten sind einerseits für die Ausbildung von Myelinscheiden verantwortlich, wobei sie benachbarte Axone umwickeln. Andererseits stehen sie mit den Nervenzellen im Stoffaustausch und stützen diese, indem sie die Neurone umschließen.

Mikroglia sind befähigt, Abfallstoffe aufzunehmen und wirken bei Immunabwehrreaktionen mit. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, aufgrund unterschiedlicher Stimulationen (z.B. Zellwandbestandteile sterbender Neurone) in den aktiven Zustand überzugehen und durch ihre hohe Beweglichkeit zum Ort der Schädigung zu wandern. Die Ependymzellen kleiden die inneren Hohlräume, welche mit Liquor cerebrospinalis gefüllt sind, aus.

1.1.2.1. Aufbau der Astrozyten

Astrozyten sind die am häufigsten vorkommenden und gleichzeitig die größten Gliazellen. Charakteristisch ist die unregelmäßige, sternenförmige Morphologie, wobei die Zellen relativ lange Fortsätze aufweisen. Da sie keine einheitliche Population bilden, sind sie in protoplasmatische Astrozyten und Faserastrozyten zu unterscheiden. Astrozyten enthalten spezifische zytoplasmatische Intermediärfilamente, wie das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP), welches immunzytochemisch nachgewiesen werden kann.

Außerdem treten die Zellen mit ihren Fortsätzen bzw. Endigungen (Endfüßchen) an die Oberflächen von Nervenzellen, Gehirn sowie Rückenmark heran. Dabei bedecken sie Kapillaroberflächen und sind in der Lage Diffusionsbarrieren auszubilden (Abb. 1.2.).

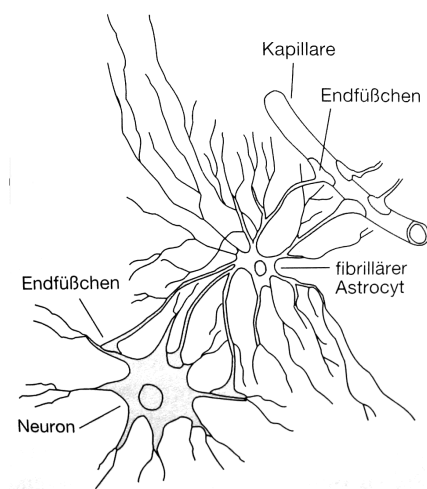


Abb. 1.2.

Schematische Darstellung von fibrillären (faserigen) **Astrozyten**, welche mit ihren Endfüßchen in Kontakt mit Kapillaren, aber auch mit Neuronen stehen.

[Kandel *et al.*, 1996; Seite 80]

1.1.2.2. Aufbau der Neurone

Aufgrund der Vielfalt der Nervenzellen werden sie anhand morphologischer und funktioneller Gesichtspunkte klassifiziert. Des Weiteren unterscheidet man zwischen Interneuronen und neuroendokrinen Zellen.

Neurone bestehen in ihrer charakteristischen Morphologie aus dem Zellkörper (Soma, Perikaryon), mehreren Dendriten und einem Axon (Neurit). Das Axon, welches von einer Myelinscheide umgeben wird, leitet die von den Dendriten empfangenen Erregungen weiter. In einer vereinfachten Darstellung wird das Eingangssignal im Perikaryon verarbeitet und führt zu einer Veränderung des Zellpotentials. Anschließend wird ein weiterführendes Signal über das Axon an benachbarte Nervenzellen übertragen. Die Signalübertragung erfolgt an den Synapsen, welche die Kontaktstelle zwischen dem Axon eines sendenden Neurons und den Dendriten der Nachbarzellen (Neuronen, Muskelzellen) bilden. Dabei kann ein Axon mit über 1000 weiteren Neuronen Synapsen bilden (Abb. 1.3.).

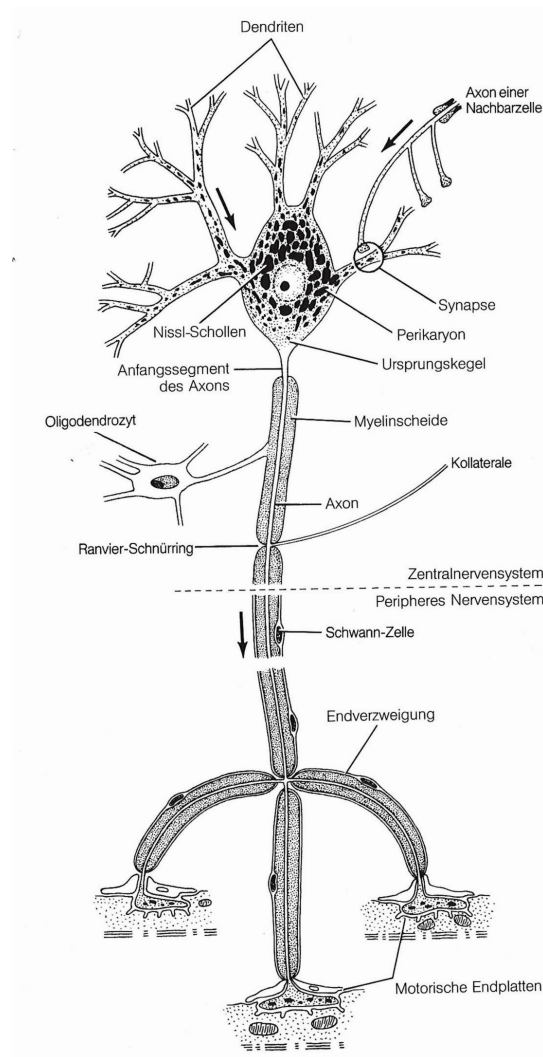


Abb. 1.3. Schematische **Darstellung eines Motoneurons**. Das Neuron besteht aus einem Zellkörper (Perikaryon), dem Zytoplasma sowie den baumartig verzweigten Dendriten. Im ZNS sowie im PNS wird das Axon der Nervenzelle durch die Myelinscheide (Markscheide) gestützt. Im ZNS wird diese durch Oligodendrozyten und im PNS von Schwann-Zellen gebildet. [Junqueira *et al.*, 1996; Seite 243]

Um eine Erregung der Nachbarzellen zu erzeugen, können gespeicherte chemische Signalstoffe (Neurotransmitter) an den axonalen Endigungen ausgeschüttet werden. Diese Transmittersubstanzen können entweder eine Erregung (Depolarisation) oder eine Hemmung (Hyperpolarisation) bewirken.

Da in den aufgeführten Untersuchungen insbesondere die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen im Vordergrund stand, ist der Neurotransmitter Dopamin hervorzuheben. Dieser Botenstoff zählt zu den Monoaminen und wird aus den Dendriten dopaminerger Neurone in der Substantia nigra freigesetzt.

1.1.3. Dopamin und das dopaminerge System

Dopaminerge Neurone kommen insbesondere in der Substantia nigra pars compacta vor, welches nur eins der drei bedeutenden Dopaminsysteme im adulten Gehirn darstellt. Die Substantia nigra (schwarze Substanz) ist im Mesenzephalon (Mittelhirn) lokalisiert. Da hier die Somata der dopaminergen Neurone liegen, welche Neuromelanin enthalten, ergibt sich die schwarze Färbung des Gewebes. Sie gehört zu den tiefliegenden Strukturen der beiden Gehirnhemisphären, welche als Basalganglien bezeichnet werden. Hierzu zählt ebenfalls das Putamen, der Nucleus caudatus sowie der Globus pallidus. Das Putamen und der Nucleus caudatus werden auch unter dem Begriff Striatum (Streifenkörper) zusammengefasst.

Die Basalganglien bilden durch ihre Verbindungen untereinander einen Regelkreis zur Kontrolle motorischer Bewegungsabläufe. Daraus geht hervor, dass ein Defekt dieser Strukturen das Krankheitsbild des Morbus Parkinson hervorruft. Dabei spielen die dopaminergen Verbindungen der Substantia nigra über Leitbahnen zum Striatum eine entscheidende Rolle. Die Degeneration der Dopaminneurone führt zu einer verringerten Expression an Dopamin im Zielgewebe, welches sowohl in den Axonendigungen als auch im Soma und den Dendriten gespeichert werden kann [Bjorklund und Lindvall, 1975].

1.1.3.1. Dopaminsynthese und Abbau

Dopamin, ein Neurotransmitter des nigrostriatalen Gewebes, wird in mehreren Reaktionen aus der Aminosäure L-Phenylalanin gebildet. Die Aminosäure wird nach Umsatz in der Leber als L-Tyrosin vom Gehirn aufgenommen (Abb. 1.4.). Somit kann im ersten Syntheseschritt durch eine Hydroxylierung am Phenolring des Tyrosins 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) entstehen. Die dabei notwendige Tyrosin-Hydroxylase (TH) kommt in den Katecholamin-produzierenden Neuronen vor und wird meist zur immunzytochemischen Detektion dieser Neurone verwendet. Durch eine Abspaltung der CO₂-Gruppe durch das Enzym Dopa-Carboxylase wird Dopamin synthetisiert. Da die beiden Hydroxylgruppen des Phenolrings leicht abgespalten werden können, kann durch Oxidation der elektrochemische Nachweis mittels High Liquid Performance Chromatography erfolgen.

Die Regulation der TH-Enzymaktivität erfolgt durch die Endproduktkonzentration [Nagatsu *et al.*, 1964], wobei diese auch durch Alterungsprozesse deaktiviert werden kann [De La Cruz *et al.*, 1996b]. Sind die Nervenendigungen mit weiteren Enzymen, wie Dopa- β -Monooxygenase oder Phenylethanolamin-N-methyltransferase ausgestattet, so entstehen die Endprodukte Noradrenalin oder Adrenalin [Löffler und Petrides, 1997].

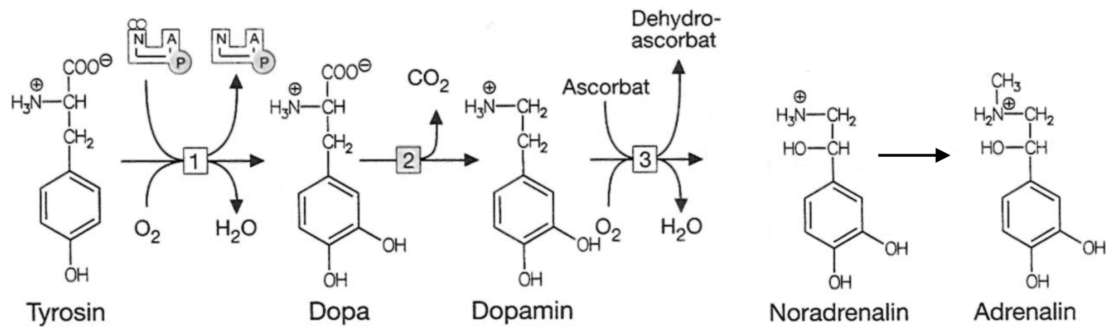


Abb. 1.4. **Biosynthese der Katecholamine.** Die Aminosäure Tyrosin bildet den Ausgangspunkt, welche durch Hydroxylierung zu L-Dopa umgesetzt wird. (1) Das katalysierende Enzym ist die Tyrosin-Hydroxylase. (2) Im zweiten Schritt erfolgt die Dopaminsynthese durch die Dopa-Carboxylase (Decarboxylierung). (3) Weitere Neurotransmitter, Noradrenalin und Adrenalin, werden durch die anschließende Hydroxylierung der Dopa-β-Monooxygenase synthetisiert. [modifizierte Darstellung nach Koolman und Röhm, 1998; Seite 335].

Am Abbau des Dopamins sind hauptsächlich die beiden Enzyme, Monoaminoxidase-B (MAO-B) und Katecholamin-O-methyltransferase (COMT) beteiligt. MAO ist vorwiegend an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert [Costa *et al.*, 1972], während die COMT in fast allen Zellen vorkommen kann. Als Zwischenprodukte entstehen 3,4-Dihydroxy-phenylethylsäure (DOPAC) sowie die Homovanillinsäure.

Das in den Vesikeln der Nervenendigungen gespeicherte Dopamin wird nach Eingang eines Erregungssignals in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort diffundiert es zu den spezifischen Dopamin-Rezeptoren, welche in verschiedene Rezeptorfamilien eingeordnet werden (D₁- und D₂-Rezeptoren). So kann die Nervenzelle durch eine Depolarisation (D₁-Rezeptor-vermittelt) oder eine Hyperpolarisation (D₂-Rezeptor-vermittelt) stimuliert werden.

Die Wirkung von Dopamin auf das motorische System wurde anhand eines adulten Rattenhirns untersucht. Durch Verabreichung des Neurotransmitters konnte eine erhöhte Spontanbewegung der Ratte beobachtet werden [Jackson und Kelly, 1983], was durch die erhöhte Expression von γ-Aminobuttersäure (GABA) erklärt werden kann. GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn.

Des Weiteren ist das Dopaminsystem ein wichtiger Teil des Belohnungssystems, welches durch Amphetamin und Kokain beeinflusst werden kann [Schmidt und Thews, 1997]. So steht das Dopaminsystem nicht nur in Verbindung mit der motorischen Aktivierung, sondern auch mit der Verarbeitung natürlicher und drogenbezogener Belohnungen (Suchtpotential). Spätfolgen des Drogenkonsums können in Form eines symptomatischen (sekundären) Parkinson-Syndroms auftreten.

1.2. Stoffwechsel des Gehirns

Das menschliche Gehirn verbraucht im Ruhezustand etwa 20% des aufgenommenen Sauerstoffs und 60% der Glukose. Bei einem gesunden Erwachsenen liegt der Glukosegehalt des Blutes bei etwa 0,8-1,2 g/L, wobei die Durchblutung des Gehirns etwa 750 ml/min beträgt. Dies weist darauf hin, dass das Gehirn der Hauptenergieverbraucher ist, wobei die Stoffwechselaktivitäten im Wesentlichen von der Sauerstoff- und Glukoseverfügbarkeit abhängen. Eine kontinuierliche Glukosezufuhr ist notwendig, da die Glycogenspeicher des ZNS sehr gering sind und der Stoffwechsel auch im Schlaf vollständig aktiv ist. Der größte Glukoseanteil wird zu Wasser und Kohlendioxid (CO_2) oxidiert, während der Rest zu Laktat und Pyruvat umgewandelt wird (Abb. 1.5.). Neuronale Zellen sind nicht in der Lage Aminosäuren zur Neusynthese von Glukose (Gluconeogenese) heranzuziehen. Jedoch können Ketonkörper vom ZNS in hohen Mengen zur Energiegewinnung oxidiert werden, um so einen Substratersatz bei längerer Hungerpause zu schaffen. [Koolman und Röhm, 1998; Löffler und Petrides, 1997]

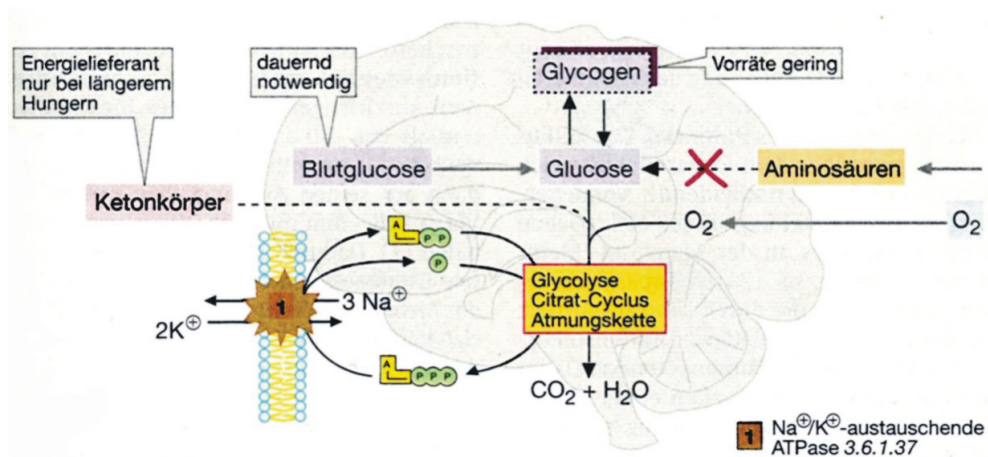


Abb. 1.5. **Energiestoffwechsel des Gehirns.** Die Hauptenergiequelle ist Glukose, welche aus dem Blutkreislauf bezogen und vorrangig zu Wasser und CO_2 umgesetzt wird. Die Energiespeicher (Glycogen) des ZNS sind sehr gering. Auch können Aminosäuren nicht zur Energiegewinnung verwendet werden, da die Gluconeogenese von neuronalen Zellen nicht durchgeführt werden kann. Ketonkörper können als Substratersatz während längerer Hungerpausen oxidiert werden. Energie muss ständig zur Verfügung stehen, da neben Syntheseprozessen vor allem die Na^+/K^+ -transportierende ATPase der Zellmembran Energie verbraucht, um das Ionengleichgewicht aufrecht zu erhalten. [Koolman und Röhm, 1998; Seite 331]

1.2.1. Stoffwechsel zwischen Neuronen und Gliazellen

Während des Stoffwechsels spielen sowohl Gliazellen (z.B. Astrozyten) als auch Neurone eine wesentliche Rolle, bei denen ein zusätzlicher Stoffaustausch untereinander zu beobachten ist (Abb. 1.6.). Dieser soll im folgenden Abschnitt zusammenfassend dargestellt werden.

Astrozyten weisen mit ihren Fortsätzen (Abb. 1.2.) einen auffälligen Kontakt mit den Endothelzellen der Blutkapillaren auf, aus denen Glukose über spezifische Rezeptoren aufgenommen wird [Janzer und Raff, 1987; Vannucci *et al.*, 1997]. Allgemein ist bekannt, dass beide Zelltypen des ZNS befähigt sind, Glukose für die Energiegewinnung zu verstoffwechseln [Peng *et al.*, 1994; Hertz *et al.*, 1999]. Dabei wird Glukose initial in der Glycolyse zu Pyruvat umgesetzt. Acetyl-CoA, welches im mitochondrialen Matrix-Raum (bevorzugt in den Neuronen) durch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) aus Pyruvat gebildet wird, kann in den Citratzyklus einfließen. Durch vollständige Oxidation kommt es zur Bildung von CO₂ und Wasser. Aus dem Stoffwechselzyklus geht neben den Reduktionsäquivalenten für die oxidative Phosphorylierung (ATP-Gewinn) auch Glutamat hervor [Hertz *et al.*, 1999]. Dies kann durch reduktive Aminierung aus α -Ketoglutarat des Intermediär-Stoffwechsels synthetisiert werden.

Gleichzeitig wird in den Astrozyten, welche vorrangig glykolytisch aktiv sind, der Umsatz von Glukose zu Laktat in erster Linie durch die Laktatdehydrogenase (LDH; Isoform 5) katalysiert. Hingegen besitzen Neurone die LDH Isoform 1, welche in der Lage ist die Reaktion von Laktat zu Pyruvat zu katalysieren [Bittar *et al.*, 1996]. Aufgrund dieser Verbindung kann das durch die Astrozyten freigesetzte Laktat von den Neuronen als Substrat aufgenommen werden [Dringen *et al.*, 1993 a und b]. Es entsteht Pyruvat, welches wiederum in den Citratzyklus zur Energiegewinnung eingeschleust wird. Somit wird Laktat vollständig oxidiert und es entstehen CO₂ und Wasser als Endprodukte, wobei die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich ist.

Da das neuronale System aus einer dicht gepackten Anzahl von Neuronen, Gliazellen sowie Oligodendrozyten besteht, ist eine Regulation des Stoffwechsels unabdingbar. Dabei sind an den Zellinteraktionen Signalgebungen beteiligt, die durch die Freisetzung von Neurotransmittern erzeugt werden [Tsacopoulos und Magistretti, 1996; Deitmer, 2000]. Diese können in benachbarten Astrozyten sowohl Ionenkanäle aktivieren als auch eine komplexe Kaskade von Signalübertragungen auslösen [Steinhäuser und Gallo, 1996]. Eine wichtige Rolle übernimmt dabei der Glutamat-Stoffwechsel an den glutamatergen Nervenendigungen und Synapsen.

Während Neurone in der Lage sind aus Glutamin Glutamat zu synthetisieren, bilden Astrozyten aus Glutamat Glutamin und setzen dieses frei [Hertz und Peng, 1992]. Zusätzlich wird Glutamat in den Astrozyten gespeichert, wobei ein erheblicher Anteil als eigene Energiequelle dient [Hertz und Schousboe, 1986 und 1988]. Infolge eines extrazellulären Glutamat-Anstiegs, kommt es zum Na^+ -Einstrom in die Zellen und zur Aktivierung des Ionentransporters Na^+/K^+ -ATPase. Dieser ist am Transportsystem der Neurotransmitter beteiligt und verbraucht einen großen Energieanteil der Zellen durch die Hydrolyse von ATP. Derartige Transportsysteme dienen der Aufrechterhaltung des Ionenaustauschs, welcher die Grundlage für den Metabolismus und die Signalleitung der Nervenzellen bildet.

Zusammenfassend wird deutlich, dass Astrozyten, welche *in vitro* und *in vivo* einen Hauptanteil des Gewebes ausmachen, bei der neuronalen Stoffwechselaktivierung eine unterstützende Rolle spielen. Bei hoher neuronaler Aktivität sorgt eine Reihe von Gliazellen für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts, die Beseitigung von Neurotransmittern in den synaptischen Bereichen und für die Signalgebung durch Calcium. Darüber hinaus stellen sie energetische Verbindungen zur Verfügung [Deitmer, 2001].

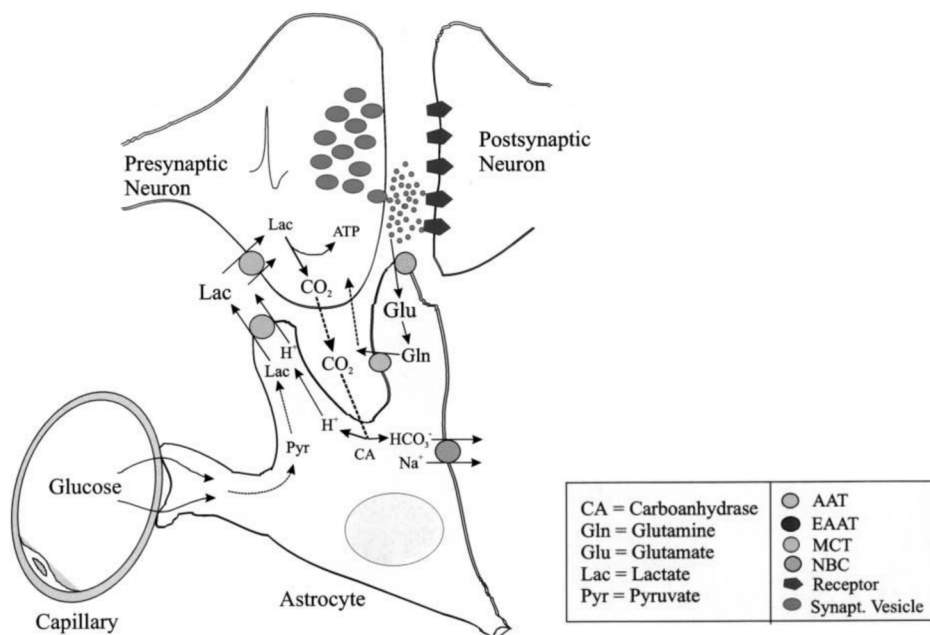


Abb. 1.6. Schematische Darstellung des **Stoffwechsels in Neuronen und Astrozyten** des ZNS. Glukose wird von den Astrozyten aus den Blutkapillargefäßen aufgenommen. Dabei stehen deren Fortsätze ebenfalls in Verbindung mit den Bereichen glutamaterger Synapsen. Aus Glukose entsteht über Pyruvat Laktat, welches von den Neuronen zusätzlich als Stoffwechselsubstrat verwendet werden kann. Bei dem oxidativen Stoffwechsel von Glukose entsteht neben ATP auch CO_2 , Wasser und Glutamat (Neurotransmitter). An den Interaktionen zwischen neuronalen und glialen Zellen sind spezifische Transporter beteiligt: Aminosäure-Transporter (EAAT, *excitatory amino acid transporter*); Laktat-Transporter (MCT, *monocarboxylate transporter*); Natriumbikarbonat-Transporter (NBC, *sodium-bicarbonate cotransporter*). (siehe auch Text) [Deitmer, 2001].

1.3. Morbus Parkinson

Das Krankheitsbild, welches auch als Schüttellähmung bekannt ist, wurde 1817 erstmals von dem englischen Arzt James Parkinson beschrieben. Morbus Parkinson ist nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und die am häufigsten vorkommende Basalganglien-Erkrankung. Etwa 150 von 100.000 Personen erkranken an dem Parkinson-Syndrom (Prävalenz) [Checkoway und Nelson, 1999], wobei sich die Neuerkrankungen (Inzidenz) vorrangig in der 6. Lebensdekade manifestieren. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung nehmen sowohl die Prävalenz als auch Inzidenz zu.

Die Erkrankung äußert sich in einer fortschreitenden Störung der motorischen Bewegungsabläufe. Es kommt zu einem Verlust der Fähigkeit Spontanbewegungen (Akinese) auszuführen. Des Weiteren sind die Muskeln zunehmend starr (Rigor), was zu einer fast maskenhaften Mimik führt. Aufgrund des erhöhten Muskeltonus kommt es zu charakteristischen Zittererscheinungen (Ruhetremor), welche an den Fingern und Händen besonders ausgeprägt sind [Kandel *et al.*, 1996]. Die unterschiedlich ausgeprägten Symptome des Patienten können durch psychische Störungen wie Depressionen und Halluzinationen begleitet werden [Aarsland *et al.*, 1999; Shabnam *et al.*, 2003]. Weitere Symptome, wie Sprachschwierigkeiten, Gleichgewichtsstörungen und zunehmender Schweißfluss (Sporrhoe) entwickeln sich sehr langsam.

Diagnosen werden zumeist erst durch das charakteristische Krankheitsbild gestellt. Bis heute gibt es trotz fortschreitender medizinischer Erkenntnisse keine biologischen Testsysteme, welche die eindeutige Diagnose ermöglichen [Riederer *et al.*, 2000]. Jedoch gewinnen bildgebende Verfahren wie das PET (Positronen-Emissionstomographie) und SPECT (Single-Photon-Emissions-Computertomographie) zunehmend an Bedeutung, da sie in der Lage sind Stoffwechselveränderungen der Neurotransmitter darzustellen [Eidelberg und Edwards, 2000; Marek *et al.*, 1996].

1.3.1. Pathologie

Morbus Parkinson ist zum einen gekennzeichnet durch die selektive Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra. Diese hat eine Verarmung des Neurotransmitters Dopamin im Striatum zur Folge, da die Projektion aus der Pars compacta verloren geht [Marsden, 1990; Ehringer und Hornykiewicz, 1960]. Überschreitet der Verlust nigraler Neurone den Schwellenwert von 50-60% [Marsden, 1982; Fearnley und Less, 1991; Foley und Riederer, 1999], so kommt es zu einem neurochemischen Ungleichgewicht von Dopamin zu Acetylcholin. Der Neurotransmitter Acetylcholin wirkt erregend und ist

beispielsweise in neuromuskulären Synapsen vorzufinden. Je höher der Verlust an Dopamin ist, desto stärker sind die Veränderungen der Basalganglien und folglich die Parkinson-Symptome [Müller *et al.*, 1999]. Mentale und endokrine Funktionsstörungen werden auf extranigrale Veränderungen zurückgeführt [Braak *et al.*, 1998], da Degenerationen auch in anderen Gehirnbereichen vorzufinden sind [Lang und Lozano, 1998].

Zum anderen lassen sich sogenannte „*Lewy bodies*“ in den degenerierenden Dopaminneuronen nachweisen, welches zytoplasmatische Einschlüsse sind. Diese bestehen unter anderem aus α -Synuclein [Spillantini *et al.*, 1997], Ubiquitin [Gai *et al.*, 1995] und aggregierten Neurofilamenten [Pollanen *et al.*, 1993]. *Lewy bodies* können jedoch auch bei anderen Erkrankungen und im Alterungsprozess des Gehirns nachgewiesen werden [Löschmann und Schulz, 1997].

1.3.2. Pathogenese

Morbus Parkinson wird häufig auch als idiopathische Erkrankung bezeichnet, da die auslösende Ursache nicht definiert werden kann. Bei der selektiven Degeneration dopaminergischer Zellen spielt neben dem natürlichen Zelltod eine Vielzahl pathologischer Faktoren eine Rolle. Dabei können degenerative Prozesse mit inflammatorischen Erkrankungen, mitochondrialen und genetischen Defekten, Exzitotoxizität, Umweltfaktoren, oxidativen Stress und apoptotischen Prozessen verbunden werden [Fahn und Cohen, 1992; Larkin, 1999; Sherer *et al.*, 2001]. Dennoch konnte anhand einzelner Untersuchungen keine spezifische Ursache identifiziert werden, wodurch eine Weiterentwicklung der Behandlungsmöglichkeiten weitgehend verhindert wurde [Jenner und Brin, 1998].

1.3.2.1. Oxidativer Stress

Verschiedenste Untersuchungen zur Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankung konzentrieren sich auf die Rolle des oxidativen Einflusses. Hierbei ist die erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) von zentraler Bedeutung. Da jede Zelle einen antioxidativen Schutzmechanismus aufweist, spricht man erst dann von oxidativem Stress, wenn das Gleichgewicht zwischen dem antioxidativen und pro-oxidativen System zu Gunsten der ROS-Produktion verschoben wird. Dabei können ROS aus verschiedensten Quellen stammen, worauf im Abschnitt „Bildung freier Radikale“ näher eingegangen wird. ROS sind Moleküle, welche ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen und aufgrund ihrer hohen Reaktivität Zellschädigungen hervorrufen. [Halliwell, 1989] Zu ihren Vertretern gehören das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das hoch reaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Die wichtigsten ROS sind hingegen Peroxynitrit (ONOO^-) und Stickstoffmonoxid (NO^\cdot) [Wei *et al.*, 2000; Jenner, 2003]. Sie sind in der Lage mit Membranrezeptoren zu reagieren [Bowling und Beal, 1995], welche bei der Signalübertragung eine wesentliche Rolle spielen, und durch Strukturveränderungen zur Inaktivierung und zu Funktionsstörungen von Enzymen beitragen können. Ferner reagieren sie leicht mit ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran und können diese schädigen. Treten sie mit der DNA in Kontakt, so verursachen sie deren Veränderung [Yoritaka *et al.*, 1996]. Als Folge können Gewebeschädigungen sowie der anschließende Zelltod auftreten [Halliwell, 1992; Jenner und Olanow, 1996; Coyle und Puttfarcken, 1993].

1.3.2.2. Oxidativer Stress durch die Bildung freier Radikale

Nachfolgend sollen die Quellen der Radikalbildung ansatzweise beschrieben werden, welche vor allem bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson mitwirken. In Abb. 1.7. wird ein zyklischer Prozess dargestellt, der die an der neuronalen Degeneration beteiligten Komponenten veranschaulicht [Bowling and Beal, 1995]. Es wird deutlich gemacht, dass oxidativer Stress sowohl oxidative Schädigungen als auch den intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} verursachen kann, wodurch wiederum der Energiestoffwechsel der Zelle beeinflusst wird.

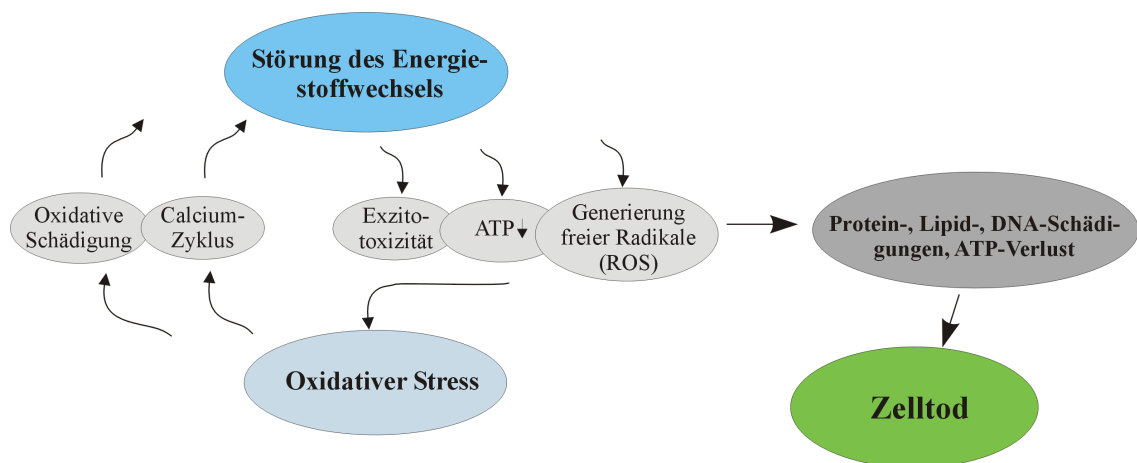


Abb. 1.7. Darstellung der möglichen Wechselwirkungen zwischen der Störung des Energiestoffwechsels und dem Einfluss durch oxidativen Stress bei der Pathogenese des Morbus Parkinson. [Modifikation nach Bowling und Beal, 1995].

Oxidative Schädigungen der Zellen können einerseits durch die Freisetzung von Glutamat (**Exzitotoxizität**) verstärkt werden [Beal, 1992 und 1998]. Diese Aminosäure ist ein wichtiger Neurotransmitter im Gehirn und kann bei erhöhter Freisetzung auch neurotoxische Eigenschaften aufweisen.

Glutamat wird unter anderem über einen spezifischen Glutamat-Rezeptor [N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Ionenkanalrezeptor] vermittelt, welcher z.B. die Gedächtnisleistungen steuert. Der NMDA-Rezeptor ist der am häufigsten vertretene Glutamat-Rezeptor im Striatum und ist nicht nur für Na^+ und K^+ , sondern auch für Ca^{2+} permeabel [Kandel *et al.*, 1996]. Bei einer massiven Freisetzung von extrazellulärem Glutamat kommt es zu einer Stimulation des Rezeptors, was zu einem zunehmenden Calcium-Einstrom in die Zelle führt [Greenamyre und Porter, 1994; Zeevalk *et al.*, 1998]. Es folgt die Aktivierung von Proteinkinasen, Endonukleasen, Stickstoffoxidsynthasen, Phospholipasen sowie Proteasen. Die Reaktionskaskade führt zu einer konsekutiven DNA-Fragmentierung, Proteolyse und dem Membranabbau. Außerdem wird die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies wie Stickstoffoxid (NO) erhöht [Coyle und Puttfarcken, 1993; Meldrum und Garthwaite, 1990].

Als wichtigste Radikalquelle wird der **mitochondriale oxidative Stoffwechsel** diskutiert, wobei Sauerstoff zu Wasser reduziert und Energie gewonnen wird. Während der oxidativen Phosphorylierung, welche in fünf Proteinkomplexen des Mitochondriums lokalisiert ist, entsteht ATP. Diese Stoffwechselreaktionen bilden dabei den größten Anteil an freien Radikalen, welche als Zwischenprodukte hervorgehen [Boveris und Chance, 1973]. Gleichzeitig reagiert das mitochondriale System empfindlich gegenüber der Schädigung durch eigens gebildete ROS [Beal *et al.*, 1993; Mizuno *et al.*, 1998; Bowling und Beal, 1995; Beal, 2003].

Neben den biochemischen Reaktionen der Zelle kann ein **Sauerstoffüberschuss** (Hyperoxia) ebenfalls zu einer verstärkten Bildung von ROS führen [Jones, 1985]. Auch wenn Sauerstoff eine essentielle Energiequelle für den Organismus darstellt, so kann er gleichzeitig schädigend auf die Zellen wirken, was in der Existenz ungepaarter Elektronen begründet ist. Man spricht hier von dem so genannten „Sauerstoff-Paradoxon“ [Davies, 1995].

Ferner ist die Substantia nigra im Vergleich zum restlichen Gehirn einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt, da auch der **Dopamin-Katabolismus** durch chemische sowie enzymatische Mechanismen an der Degeneration dopaminerge Neurone beteiligt ist [Jenner und Olanow, 1996; Barzilai *et al.*, 2003a und b; Masserano *et al.*, 2000]. Dopamin kann unter Anwesenheit von Sauerstoff autoxidativ umgesetzt werden, wobei neben exzessiven Mengen an H_2O_2 auch Semichinone entstehen, welche selbst toxisch wirken. Die anschließende Reaktionskaskade führt zu einer Polymerisierung und folglich zu einer erhöhten Bildung von Neuromelanin. Da der Körper nicht in der Lage ist Neuromelanin abzubauen, wird es in der Substantia nigra akkumuliert [Graham, 1978] und schränkt nachhaltig die Zellfunktionen ein. Es resultiert nicht nur ein erhöhter intrazellulärer Eisenspiegel, sondern ebenfalls eine steigende ROS-Produktion [Olanow, 1990].

1.3.2.3. Antioxidative Mechanismen

Als Abwehrmechanismen gegen ROS und somit gegen oxidativen Stress weisen Zellen unterschiedliche Antioxidantien auf. Diese sind Reduktionsmittel, die zum Schutz wichtiger Moleküle schnell mit oxidierenden Verbindungen reagieren. Das größte Abwehrsystem setzt sich aus den enzymatischen Antioxidantien Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase (GSH Per), Glutathion-Reduktase (GSH Red) sowie der Katalase (Kat) zusammen [Cohen, 1983].

Einen zusätzlichen Schutz gegen ROS bieten die biologischen nicht-enzymatischen Antioxidantien wie α -Tocopherol (*Vitamin E*) und Ascorbinsäure (*Vitamin C*) [Rose und Bode, 1993]. Das in der Membran lokalisierte lipidlösliche α -Tocopherol bewirkt den Kettenabbruch der Radikalbildung, um so eine Lipidperoxidation zu verhindern. Bei dieser Reaktion entsteht das Tocopherylradikal, welches mit Hilfe der wasserlöslichen Ascorbinsäure regeneriert werden kann [Chan, 1993; Davies, 2000b]. Ascorbinsäure kommt in vesikulären Kompartimenten spezifischer Neurone vor und dient als Cofaktor in verschiedenen biochemischen Reaktionen, einschließlich der Dopaminsynthese. Darüber hinaus agiert es als Radikalfänger [Padh, 1990]. Bei direktem Kontakt mit freien Radikalen erfolgt die Oxidation zu Dehydroascorbat [Gilgun-Sherki *et al.*, 2001], was wiederum unter Beteiligung von Glutathion zu Ascorbat umgewandelt werden kann. Menschen und Primaten besitzen nicht die Fähigkeit Vitamin selbst zu synthetisieren, während Säugetiere, wie die Ratte und Maus, Ascorbinsäure aus der Leber gewinnen [Chatterjee *et al.*, 1975]. Untersuchungen haben ergeben, dass Ascorbinsäure in hohen Konzentrationen im Gehirn vorkommt [Schreiber und Trojan, 1991].

1.3.2.4. Apoptose und Nekrose

Beide Degenerationsmechanismen dienen der Regulation eines dynamischen Gleichgewichts zwischen der Zellproliferation und dem Zelltod. Die Initiierung der Apoptose als auch der Nekrose erfolgt durch Reize (z.B. oxidativer Stress, mitochondriale Funktionsstörungen, Mangel an Wachstumsfaktoren), wobei sie durch unterschiedliche pathologische Mechanismen gekennzeichnet sind (Abb. 1.8.).

Während die Nekrose ein früher Prozess ist, tritt der aktive apoptotische Prozess mit einer zeitlichen Verzögerung auf. Dabei bestimmen Faktoren wie die Reizstärke, die Dauer der Reizeinwirkung sowie der intrazelluläre ATP-Gehalt, auf welchem Weg die Zellen letztendlich degeneriert werden.

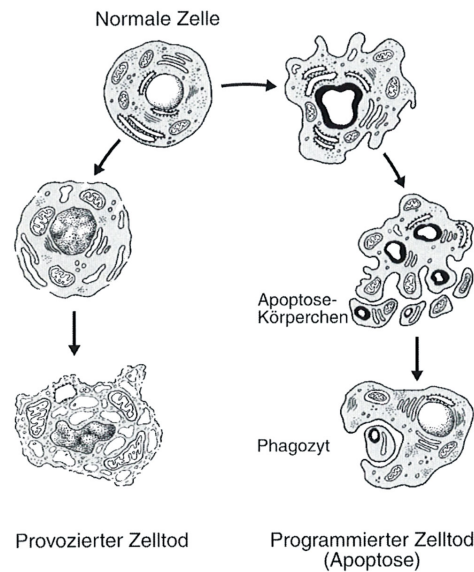


Abb. 1.8. Darstellung der **Degenerationsmechanismen** einer Zelle. Nekrose, der provozierte Zelltod, führt zu einer Autolyse und Karyolyse (Auflösung des Zellkerns). Die Apoptose ist der programmierte Zelltod und betrifft einzelne Zellen, welche einem Zerfall in Apoptose-Körperchen unterliegen. Die Zellfragmente können anschließend durch Phagozytose von benachbarten Zellen aufgenommen werden. [Junqueira *et al.*, 1996; Seite 95]

Nekrose

Zellen, die schweren oder plötzlichen Schädigungen ausgesetzt werden, reagieren vorwiegend mit nekrotischen Mechanismen (provozierter Zelltod). Da diese mit einem Verlust der Membranintegrität und des osmotischen Gleichgewichts einhergehen, kommt es zu einer Anschwellung der Zellkörper und zur Zerstörung von Zellorganellen. Durch die Freisetzung der Fragmente treten außerdem entzündliche Begleitreaktionen auf.

Apoptose (griechisch: abfallen)

Oxidativer Stress wird zunehmend in die Pathogenese des Morbus Parkinson impliziert [Payne *et al.*, 1995; Owen *et al.*, 1996; Hoyt *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 2000; Kannan und Jain, 2000] und wird aufgrund dessen an dieser Stelle detailliert erläutert. Dieser Stressparameter kann aber auch ein Vermittler apoptotischer Einflüsse durch verschiedene Stimulationen sein [Ziv *et al.*, 1994 und 1998]. Dabei können initiale Reize wie Funktionsstörung des mitochondrialen Komplex I [Hartley *et al.*, 1994], der Dopamin-Katabolismus, Glutamat [Kure *et al.*, 1991], Calcium [Orrenius und Nicotera, 1994] und inflammatorische Mediatoren [Mogi und Nagatsu, 1999] die auslösende Ursache für eine Apoptosekaskade sein.

Die apoptotischen Mechanismen stellen im Gegensatz zur Nekrose ein genetisch determiniertes, aktives Sterbeprogramm der Zelle dar (programmierter Zelltod) [Hockenbery, 1995]. Der Apoptose kommt eine wichtige Bedeutung in der normalen Embryonalentwicklung des Gehirns zu [Itoh *et al.*, 2001] und ist notwendig bei der Entwicklung des Nervensystems von Vertebraten und Invertebraten. Apoptose tritt aber auch bei der Zellregeneration in adultem Gewebe und der Entwicklung des Immunsystems auf [Cohen, 1993]. Dabei werden apoptotische Signale durch stimulierende oder hemmende extrazelluläre Faktoren ausgelöst [Searle *et al.*, 1982]. So stellt die Apoptose den Antagonisten zur Mitose dar, wodurch unerwünschte (kranke, cancerogene) oder nicht mehr gebrauchte Zellen eliminiert werden.

Die energieverbrauchenden apoptotischen Reaktionen setzen einen bestimmten intrazellulären ATP-Gehalt voraus und verursachen eine stufenweise **morphologische Veränderung** der betroffenen Zellen [Arends *et al.*, 1990]: Chromatinkondensation (sichelförmiger Kern) [Earnshaw, 1995], Zellschrumpfung durch Dehydrierung, Verdichtung der Zellorganelle und Ausdehnung des Endoplasmatischen Retikulums (ER), Ausstülpung der Zellmembran, Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis), Abschnürung membranumschlossener Vesikel (Apoptose-Körperchen). Letztlich werden die Zellreste durch die Phagozytose von benachbarten Zellen und Makrophagen aufgenommen und abgebaut, um eine inflammatorische Reaktion zu vermeiden.

Nicht selten ist es der Fall, dass eine sekundäre Nekrose sich anschließt, da die Energiereserven für die Weiterführung der Apoptose aufgebraucht sind [Hirsch *et al.*, 1997]. Des Weiteren sind **biochemische Ereignisse** wie der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels charakteristisch, wodurch second messenger (Calmodulin, cAMP) aktiviert werden und eine Veränderung spezifischer Enzymaktivitäten auslösen. So werden beispielsweise Endonukleasen aktiviert, die eine internukleosomale Fragmentierung der DNA katalysieren [Liu *et al.*, 1997]. Weiterhin können Transglutaminasen die Bildung zytoplasmatischer Proteinaggregate verursachen.

Da der programmierte Zelltod einer **genetischen Steuerung** unterliegt, werden durch spezifische Signalvermittlungen Apoptosekaskaden in der Zelle ausgelöst. Dabei spielen sowohl extrazelluläre Signale, Rezeptor-vermittelte (extrinsische), aber auch durch schädliche Einflüsse verursachte mitochondriale Funktionsstörungen (intrinsisch) eine bedeutende Rolle. Vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen wird den mitochondrialen Mediatoren eine wichtige Rolle zugeschrieben. Das zentrale Ereignis einer apoptotischen Kaskaden liegt in der Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7), wodurch es letztendlich zur Zerstörung des Zytoskeletts und der DNA-Fragmentierung kommt [Arends *et al.*, 1990; Compton, 1992; Wyllie *et al.*, 1992; Jeon *et al.*, 1999].

1.3.3. Therapieansätze zur Behandlung des Morbus Parkinson

In Deutschland sind etwa 250.000 Menschen von der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson betroffen. Da die Erkrankung neben einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität, wie sie eingangs beschrieben wurde, auch hohe wirtschaftliche Kosten in sich birgt, ist das Interesse an der Weiterentwicklung bestehender und neuer Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren stetig gewachsen. Dabei bilden die Erkenntnisse unterschiedlicher Forschungsansätze den Ausgangspunkt, welche sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung befinden. Sowohl pharmakologische als auch operative Methoden werden detailliert untersucht, um die pathologischen Prozesse der Krankheit einschränken oder sogar hemmen zu können [Calne, 1993; Jankovic, 1999].

Die Krankheitssymptome können bis heute nur symptomatisch behandelt werden, da die Ursachen der selektiven Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra und das damit verbundene Dopamin-Defizit nicht vollständig verstanden sind.

1.3.3.1. Pharmakotherapie

Die derzeitig häufigste Behandlungsmethode, der an Morbus Parkinson erkrankten Patienten beruht auf dem Einsatz von Medikamenten. Dabei hat sich die Gabe von L-Dopa (Levodopa) als Standardtherapie etabliert, welches eine Vorstufe bei der Synthese des Dopamins ist und günstige Effekte auf die Symptome (Rigor, Tremor, Akinese) der Erkrankung hat [Djaldetti und Melamed, 2001; Birkmayer und Hornykiewicz, 1961]. Hintergrund ist die Fähigkeit des L-Dopa, über aktive Carriersysteme die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit in das ZNS zu gelangen. Im Gehirn wird es anschließend zu Dopamin dekarboxyliert. Die Behandlung kann jedoch nur über einen begrenzten Zeitraum erfolgen, da die Wirkung des Medikaments nachlässt und die Konzentrationen während der Therapie kontinuierlich erhöht werden müssen [Calne, 1993; Marsden, 1990]. Aufgrund der entstehenden Nebenwirkungen erhöhter L-Dopa-Konzentrationen werden heute zu Beginn der Behandlung andere Medikamente eingesetzt, um so eine zeitliche Verzögerung zu erreichen [Jenner und Brin, 1998]. Weitere Studien ergaben, dass L-Dopa aufgrund seiner Dopamin-ähnlichen Struktur gleichen Abbauwegen unterliegt und somit zur erhöhten Bildung freier Radikale führen kann [Nakao *et al.*, 1997]. Daher werden bei der Therapie zusätzlich Medikamente verwendet, welche den Abbau von L-Dopa und Dopamin hemmen. So konnte anhand einer Langzeituntersuchung gezeigt werden, dass eine zusätzliche Verabreichung von Deprenyl, einem irreversiblen Monoaminoxidase-B (MAO-B)-Hemmer, die Lebenserwartung der Parkinson-Patienten verlängert [De La Cruz *et al.*, 1996a; Birkmayer *et al.*, 1985].

Alternative Behandlungsmöglichkeiten stützen sich auf die Gabe von Dopamin-Agonisten (z.B. Pramipexol oder Bromocriptin). Die Wirkung beruht auf der Signalübertragung durch Dopamin-Rezeptoren, wobei eine Kombination mit L-Dopa möglich ist [Tulloch, 1997]. Die vorteilhafte Wirkung der Dopamin-Agonisten liegt unter anderem in der Abnahme des oxidativen Stresses sowie der Erhöhungen des radikalabbauenden Enzyms Superoxid-Dismutase [Zou *et al.*, 1999; Sawada *et al.*, 1998]. Zudem konnte eine neuroprotektive Wirkung auf die Überlebensrate dopaminergener Neurone *in vitro* nachgewiesen werden [Zou *et al.*, 1999].

Außerdem kommen antiglutamaterge Substanzen zum Einsatz, welche durch die Senkung der Exzitotoxizität neuroprotektive Wirkungen aufweisen [Blandini und Greenamyre, 1998]. Anticholinergika tragen dazu bei, die Balance zwischen striatalem Acetylcholin und Dopamin herzustellen. Aufgrund ihrer unzureichenden Wirkung werden sie heute lediglich bei ungenügender Ansprechbarkeit von L-Dopa eingesetzt.

Wie bereits eingehend beschrieben wurde, wird vor allem oxidativer Stress bei der Pathogenese des Morbus Parkinson als eine Hauptursache diskutiert. Daher ist es nahe liegend, dass neben den genannten Medikamenten, mit teilweise radikalfangender Wirkung, auch natürliche Radikalfänger verwendet werden. Dabei werden vorrangig die Einflüsse natürlicher Antioxidantien wie α -Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C) untersucht.

1.3.3.2. Chirurgische Therapieansätze

Da Medikamente lediglich die Symptomatik behandeln und ein Fortschreiten der Erkrankung nicht verhindert wird, werden alternative Therapiemöglichkeiten erforscht. Dabei stehen invasive Methoden zur Diskussion, welche vorerst auf sehr schwere Fälle beschränkt sind, bei denen die medikamentöse Behandlung keinen Erfolg zeigt.

Neben einigen anderen Behandlungsmöglichkeiten, wie der Tiefenhirnstimulation [Benabid *et al.*, 1991], stereotaktische Läsionen oder dem Gentransfer [z.B. lentiviraler *glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF)-Transfer] [Dunnett und Bjorklund, 1999; Iacono *et al.*, 1995], werden intrastriatale Transplantationen von embryonalen Dopaminneuronen als eine viel versprechende klinische Therapiemöglichkeit bei Morbus Parkinson in Betracht gezogen. Das Ziel besteht darin, einen funktionellen Ersatz für die in der Substantia nigra degenerierten Dopaminneurone zu schaffen [Nikkhah und Brandis, 1995; Lindvall, 2000 und 2001].

Hintergrund der Zelltherapie

Bereits seit 1974 werden Implantationsexperimente im Tiermodell (z.B. der Ratte) durchgeführt, deren Ergebnisse bis heute zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Morbus Parkinson beitragen. Weiterführende Studien konnten zeigen, dass die dopaminergen Zellen eines intrastriatalen Transplantats embryonaler mesenzephaler Neurone durchaus funktionelle Charakteristiken aufwiesen. Auf dieser Grundlage wurden 1987 erste Implantationen in das Striatum von Patienten mit humanen embryonalen mesenzephalen Zellen durchgeführt [Lindvall, 2003]. Dabei wurden sowohl Nebennierenmarkszellen als auch autologes embryonales Gewebe verwendet. Die Studien haben ergeben, dass die dopaminergen Neurone tatsächlich im Zielgewebe (Corpus striatum) überlebten und zu einer Symptomverbesserung führen konnten [Lindvall, 1997 und 1998; Wenning *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1999; Kordower *et al.*, 1998]. In den letzten 13 Jahren erhielten etwa 350 Patienten Transplantate humaner fetaler Dopaminneurone, welche in den ersten sechs Monaten nach dem chirurgischen Eingriff verbesserte Bewegungseigenschaften aufwiesen [Clarkson, 2001; Lindvall, 2003; Freed *et al.*, 2001]. Trotz viel versprechender Ergebnisse befinden sich die Forschungsstudien noch in der Testphase und es sind Langzeitstudien abzuwarten, welche detaillierte Erkenntnisse erbringen könnten. Der Nachteil der Implantationsmethoden ist vor allem in der geringen Überlebensrate der transplantierten Neurone zu sehen. Nur etwa 5-20% der Neurone sind in der Lage nach der Transplantation zu überleben, weshalb für einen Patienten etwa 5-6 Föten benötigt werden [Nikkhah *et al.*, 1994a; Arous *et al.*, 1993].

Aufgrund der ethischen Problematik sowie einer limitierten Gewebeverfügbarkeit ist die Verwendung des humanen embryonalen Materials bis heute sehr umstritten [Lindvall, 1994]. Um diese Problematiken zu umgehen, werden alternative Möglichkeiten gesucht.

So wurde in anfänglichen Studien der Einsatz von heterologem Gewebe (z.B. aus Schweineföten) untersucht [Deacon *et al.*, 1997; Isacson und Breakefield, 1997; Schumacher *et al.*, 2000]. Allerdings spielen hier nicht nur ethische Bedenken eine bedeutende Rolle [Schumacher *et al.*, 2000]. Auch stellen diese Transplantationsverfahren aus Sicht der Gewebesicherheit sowie der Immunologie ein hohes Risiko dar.

Eine weitere Möglichkeit ist in der **Stammzell-Zellkulturtechnik** zu sehen. Hier kann das Potential von Stamm- bzw. Progenitorzellen zur *in vitro* Expansion und anschließender Differenzierung zu dopaminergen Neuronen untersucht werden. Somit könnte der Einsatz von Stammzellen eine fast unlimitierte Zellquelle schaffen [Lindvall, 2003]. In diesem Zusammenhang wurden verschiedenste Kultivierungsbedingungen und Stammzellquellen untersucht.

So konnten Studien unterschiedlicher Forschungsgruppen die Generierung dopaminerger Neurone aus murinen embryonalen Stammzellen sowie einer immortalisierten Stammzelllinie aufweisen [Lee *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 1999]. Ebenfalls ist es Studer *et al.* erfolgreich gelungen, dopaminerge Progenitoren aus dem Mesenzephalon der Ratte zu expandieren [Studer *et al.*, 1998], wobei Yan *et al.* die Differenzierungseffizienz dieser Zellen durch die Supplementierung von Ascorbinsäure erhöhen konnten [Yan *et al.*, 2001]. Nicht zuletzt haben heute auch die Haut- und Knochenmark-Stammzellen das Interesse der neurobiologischen Forschung geweckt [Mezey *et al.*, 2000; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Toma *et al.*, 2001].

Dabei erlaubt es der Einsatz von **Parkinson-Tiermodellen**, die kultivierten Zellen zu implantieren und die neurologisch-funktionelle Wirksamkeit zu untersuchen. An dieser Stelle sollen die beiden am besten untersuchten Modelle genannt werden.

Das im Jahre 1968 entdeckte Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) [Ungerstedt, 1968] führt nach unilateraler Injektion in die Substantia nigra des Rattenhirns zu einer Degeneration der dopaminergen Neurone. Somit kommt es selektiv zu einer massiven Dopaminverarmung im Corpus striatum [Nikkhah *et al.*, 1995]. Die Toxizität ist in der Induktion von oxidativem Stress begründet. Aufgrund der ähnlichen Dopaminstruktur wird 6-OHDA auf gleichem Weg abgebaut [Karoum *et al.*, 1993], was zur Freisetzung von H₂O₂, zur erhöhten Radikalproduktion sowie zur Schwächung des endogenen Abwehrsystems führt [Sachs und Jonsson, 1975]. In dem 6-OHDA-Tiermodell konnte gezeigt werden, dass sich, durch gezielte Mikrotransplantation embryonaler dopaminerger Zellen in das Striatum, das natürliche sensomotorische Verhalten der Tiere zu einem gewissen Teil wiederherstellen lässt [Nikkhah *et al.*, 1994 a, b, c; Löscher *et al.*, 1998].

Durch die Entdeckung von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) in den 80er Jahren konnte ein weiteres Tiermodell entwickelt werden. MPTP wurde in synthetischem Heroin gefunden und löste bei jungen Konsumenten Parkinson-Symptome aus [Langston *et al.*, 1984]. Diese chemische Substanz weist eine ähnliche selektive Neurotoxizität gegenüber Dopaminneuronen auf wie 6-OHDA.

MPTP wird in glialen Zellen in zwei Schritten zu dem toxischen Agens 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion (MPP⁺) umgesetzt. MPP⁺ wird anschließend zum einen in den Mitochondrien gespeichert, wo Funktionsstörungen ausgelöst werden können [Nicklas *et al.*, 1985]. Zum anderen wird das Neurotoxin von den Gliazellen freigesetzt und kann über selektive Dopamintransporter von dopaminergen Neuronen aufgenommen werden [Javitch *et al.*, 1985]. Die Folge eines steigenden MPP⁺-Gehalts sind die Erhöhung der ROS-Bildung, der ATP-Verlust der Zellen und schließlich die Degeneration dopaminerger Neurone [Chan *et al.*, 1991 und 1992].

Die Erkenntnisse aus den Transplantationsstudien geben Aufschluss über pathogene Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen. Außerdem können bestehende Erkenntnisse über therapeutische Strategien humaner Erkrankungen erweitert werden [Betarbet *et al.*, 2002]. Dabei stellt die Generierung dopaminerger Neurone aus Stammzellen eine viel versprechende Alternative für die Transplantation bei der Parkinson-Erkrankung dar. So besteht die Notwendigkeit mehr Kenntnisse über den Mechanismus der Zelldifferenzierung zu Dopaminneuronen zu sammeln, da sich die Stammzelltherapie noch in einer sehr frühen Phase befindet [Lindvall, 2003].

1.4. Kultivierung neuraler Progenitor- bzw. Stammzellen

Durch die Verwendung primärer Zellkulturen können detaillierte Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden, um den Einfluss neurotrophischer Faktoren zu untersuchen. Als Zellquelle dienen undifferenzierte neurale Progenitoren aus dem ventralen Mesenzephalon. Diese Zellen weisen Vorläufer- bzw. Stammzellcharakteren auf und zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit zur Proliferation aus. Des Weiteren besitzen sie im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen den Vorteil, dass sie sich besser im Empfängerorganismus integrieren können [Gage, 2000; Arenas, 2002].

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in zwei aufeinander folgenden Schritten, der Proliferation und der Differenzierung. Dazu werden in der vorliegenden Arbeit neurale Progenitoren aus dem ventralen Mesenzephalon des Rattenembryos (E11-13) isoliert. Die Entwicklung der Dopaminneurone in diesem Bereich des Rattenhirns beginnt ab dem 11. Tag der Embryonalentwicklung (E11) und setzt sich bis zum 15. Tag (E15) fort [Lauder und Bloom, 1974].

Vorangehende Studien zur ***in vitro* Proliferation** der Progenitoren haben gezeigt, dass die Supplementierung von neurotrophischen Faktoren (Wachstumsfaktoren) einen erheblichen Einfluss haben. Außerdem spielen sie bei der strukturellen Entwicklung und Plastizität der Neurone eine wesentliche Rolle [Studer *et al.*, 1995]. Die Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl der *epidermal growth factor* (EGF) als auch der *basic fibroblast growth factor* (bFGF, bFGF-2) die *in vitro* Proliferation dopaminerger Progenitoren erhöht [Casper *et al.*, 1991; Knusel *et al.*, 1990]. Durch eine verbesserte Zellvermehrung kann folglich auch der Zell-Zellkontakt gewährleistet werden, welcher zum Überleben der Zellen, insbesondere nach der Isolation, beiträgt [Fawcett *et al.*, 1995].

Bei einer Behandlung nigrastriataler Gewebe mit MPTP konnte FGF-2 eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden [Unsicker, 1994]. Durch bFGF kann hingegen die Initiierung der Differenzierung in der Kultur gehemmt werden [Cameron *et al.*, 1998] und die Fähigkeit zur Zellteilung zeitlich verlängert werden [Bouvier und Mytilineou, 1995]. Somit könnte die *in vitro* Expansion neuraler Progenitoren das Problem der geringen Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials bei möglichen Transplantationen in Zusammenhang mit Morbus Parkinson beheben.

Die anschließende ***in vitro* Differenzierung** zu spezifischen neuronalen Zelltypen, wie den dopaminergen Neuronen kann mit verschiedenen Mediatoren induziert und beeinflusst werden. Einen wichtigen Parameter stellt dabei das Entwicklungsstadium der Embryonen dar [Ostergaard *et al.*, 1996], da TH-exprimierende Dopaminneurone erstmals im Entwicklungsstadium E12,5 zu beobachten sind [Specht *et al.*, 1981]. Wie in der Proliferationsphase bereits erwähnt, spielt auch hier der Zell-Zellkontakt für die Zellvitalität eine entscheidende Rolle. Hinzu kommt der Einfluss der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin, Collagen und poly-L-Lysin [Dong *et al.*, 1994]. Auch Wachstumsfaktoren, wie *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und *glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF) unterstützen die Vitalität und folglich die Überlebensrate dopaminerger Progenitoren [Burke *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1993; Ling *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1996]. Ferner tragen Supplemente wie fötales Kälberserum (FCS) und Ascorbinsäure zu einer erfolgreichen Differenzierung dopaminerger Neurone bei. FCS kann aufgrund seiner Bestandteile, wie Hormone, anorganische Salze, Aminosäuren, Spurenelemente, Wachstumsfaktoren, Bindungsproteine und Puffersysteme, die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen induzieren [Studer *et al.*, 1998]. Die Zugabe von Ascorbinsäure hat gezeigt, dass die Überlebensrate mesenzephaler Dopaminneurone erhöht werden konnte [Kalir und Mytilineou, 1991]. Des Weiteren konnte ein stimulierender Einfluss von Ascorbinsäure auf die Differenzierung von Progenitoren zu TH-exprimierenden Neuronen nachgewiesen werden [Yan *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000].

1.5. Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der *in vitro* Untersuchung der Proliferation und Differenzierung neuraler Progenitoren des embryonalen, ventralen Mesenzephalons des Rattenhirns. Dabei orientieren sich die Untersuchungen im Zusammenhang mit dem neurodegenerativen Parkinson Syndrom an einer spezifischen Differenzierung dopaminergener Neurone.

Teilergebnisse der Studien an neuralen Zellsystemen wären nicht nur ein entscheidender Beitrag für andere neurologische Erkrankungen, sondern stellen auch eine zukunftsweisende Möglichkeit dar, um ein unabhängiges Zell-Reservoir dopaminergener Neurone schaffen zu können. Weiterhin bergen die *in vitro* Zellsysteme ein großes Potential für pharmakologische Testverfahren, da durch ihre Anwendung detaillierte Grundlagenkenntnisse über den Stoffwechselmechanismus der Zellen oder eventuelle Wechselwirkungen gewonnen werden können.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

- Die *in vitro* Proliferation und Differenzierung sollen hinsichtlich des embryonalen Entwicklungsstadiums aus dem die Progenitoren stammen untersucht werden, um festzustellen, unter welchen Bedingungen eine hohe Zellausbeute an dopaminergen Neuronen erfolgen kann. Außerdem soll die Differenzierung der Zellen durch ein zeitliches Entwicklungsprofil spezifischer Marker charakterisiert werden.
- Wie einleitend erwähnt, wird der oxidative Stress und die damit verbundene Überproduktion an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) als eine Ursache für die selektive Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra bei Morbus Parkinson in Betracht gezogen. Um eine Stimulation des oxidativen Stresses auf die Zellen ohne Zusatz von Neurotoxinen (z.B. 6-OHDA, MPTP) oder Chemikalien (z.B. Kaliumzyanid) hervorzurufen, findet ein neu entwickeltes bioFolie-Membransystem Anwendung. Dieses System zeichnet sich durch eine gasdurchlässige Kulturoberfläche aus, durch die Sauerstoff medienunabhängig in die Kultur diffundieren kann. Dabei sollen die Einflüsse des oxidativen Stresses in unterschiedlichen, neuralen Zellsystemen untersucht werden (neurale Progenitoren der embryonalen Ratte, katecholaminerge Pheochromacytoma Zelllinie, Astrozytoma-Oligodendroglioma Zelllinie).

Im Mittelpunkt der Analysen stehen bei variierender Sauerstoffverfügbarkeit: (1) die Energiestoffwechselleistungen; (2) der Einfluss auf die Genexpression der Tyrosin-Hydroxylase (TH); (3) die immunzytochemischen Markierungen der Neurone (TuJ1-positiv), dopaminerge Neurone (TuJ1- und TH-positiv) sowie apoptotischer Zellen (TUNEL-positiv); (4) die Dopaminsekretion.

- Zusätzlich soll die Wirkung von Ascorbinsäure, als Antioxidantium und TH-Aktivator, im primären Zellsystem neuraler Progenitoren unter Verwendung des bioFolie-Membransystems bei unterschiedlichen Konzentrationen und variierendem Sauerstoffgehalt dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborausstattung

Array System GMS 417	Genetic MicroSystems Inc.
Binokular, Stemi 2000	Zeiss
Biochemischer Analysator YSI 2700 select	Yellow Springs Instruments
Biofuge fresco	Heraeus/ Kendro
Concentrator 5361	Eppendorf
Elektrochemischer Detektor (ECD)	Biometra
Fluoreszenz-Microplatereader FLI	Bio-Tek/ Kontron
Geldokumentation	Herolab
Gelelektrophorese und Zubehör	Biometra
HPLC System	BioTek/Kontron
Inkubator Cytoperm2	Heraeus/ Kendro
Labor-pH-Meter 766 Set B	Knick
Laserscanner GMS 418	Genetic MicroSystems Inc.
LightCycler System	Roche
Magnetrührer mit Heizplatte RCT basic	IKA
Mediumabsauger BVC 21	Vacuubrand
Mikroskop Axiovert 25 mit Zubehör	Zeiss
Mikroskop Axiovert S 100	Zeiss
Mikrowelle	Lunik
Pipetten	Eppendorf
Präzisionswaage BP 3100S	Sartorius
Pumpe Ecoline VC-380	IsmaTec
Schüttler MTS 4	IKA
Schüttler, Certomat®U	B. Braun Biotech Intern
Spectrophotometer Ultrospec 3300 <i>pro</i>	Amersham Biosciences
Sterilbank Herasafe	Heraeus/ Kendro
Thermocycler	MWG
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultraturrax T25	IKA

2.1.2. Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin	Serva, Heidelberg, D
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
B27 (Medienzusatz)	Gibco, Karlsruhe, D
Bidestilliertes Wasser	Millipore Anlage, Bedford, USA
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)	BTS, St. Leon-Rot, D
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Gibco, Karlsruhe, D
Chloroform	Baker B.V., Deventer, NL
Desoxyribonuklease (DNase)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
D-Glukose	PAA Laboratories, Cölbe, D
Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
4'-6-Diamino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Diethylether	Baker B.V., Deventer, NL
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, D
Dithiothreitol (DTT)	Gibco, Karlsruhe, D
DNA-Längenstandard (XIV)	Roche, Penzberg, D
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Takara, Shiga, Japan
Eichlösung Glukose/Laktat	Kreienbaum e.K., Langenfeld, D
Essigsäure (CH_3COOH)	Merck KG, Darmstadt, D
Ethanol, p.A.	Baker B.V., Deventer, NL
Ethanol, technisch	Baker B.V., Deventer, NL
Ethidium Bromid	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ethylenglykol-bis-aminoethylether-N,N,N,N-tetraessigsäure (EGTA)	Merck KG, Darmstadt, D
Ex Taq Puffer	Takara, Shiga, Japan
Fast Red TR Salz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Fibronektin	Gibco, Karlsruhe, D
Ficoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
5x First Strand Buffer	Gibco, Karlsruhe, D
Fixogum	Marabuwerke, Tamm, D
Glutathion	Merck KG, Darmstadt, D
Glyceringelatine, Kaisers	Merck KG, Darmstadt, D
Glycerol	Merck KG, Darmstadt, D
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, NL
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, D
Ketamin 10	Atarost, Twistingen, D
Kollagen I	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Laminin	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Levamisol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
N ₂ (Medienzusatz)	Gibco, Karlsruhe, D
Naphthol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Natriumbikarbonat (Na ₂ CO ₃)	Gibco, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Fluka, Taufkirchen, D
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe, D
Oligonukleotid dT Primer	Roche, Penzberg, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
PBS ohne Calcium und Magnesium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, D
Phosphat Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, D
poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Rompun	Bayer AG, Leverkusen, D
rRNasin RNase Inhibitor	Promega, Heidelberg, D
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Böhringer, Mannheim, D
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
TRIZMA® Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe, D
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Xylen Cyanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ziegenserum	PAA Laboratories, Cölbe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

2.1.3. Medien und Zusätze

B27 Medienzusatz	Gibco, Karlsruhe, D
Bacto Trypton	DIFCO, Detroit, USA
basic fibroblast growth factor (bFGF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe, D
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe, D
HAM's F12	Gibco, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	DIFCO, Detroit, USA
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, D
N ₂ Medienzusatz	Gibco, Karlsruhe, D
Pferdeserum	Gibco, Karlsruhe, D
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium	Gibco, Karlsruhe, D

2.1.4. Enzyme

BamH1
Ex Taq Polymerase
SuperScript II Reverse Transkriptase

Promega, Heidelberg, D
Takara, Shiga, Japan
Gibco, Karlsruhe, D

2.1.5. Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-5-Bromo-2'-desoxy-uridine (Maus anti-BrdU)
Anti-β-Tubulin III (Kaninchen anti-TuJ1)
Anti-Gliales Fibrilläres Saures Protein (Rind anti- GFAP)
Anti-Tyrosin Hydroxylase (Maus anti-TH)
Anti-Mikrotubuli-assoziiertes Protein (Maus anti-MAP2)

Roche, Penzberg, D
Convance, Princeton, USA
DAKO Diagnostika, Hamburg, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

Sekundäre Antikörper

Alkalische Phosphatase-gekoppelt
mit Ziege anti-Maus IgG
Alexa 488 (Ziege anti-Kaninchen)
Cyanine-3-Tyramide (Cy3) (Ziege anti-Maus)
Cyanine-3-Tyramide (Cy3)/Cyanine-5-Tyramide (Cy5)

Jackson ImmunoResearch,
Philadelphia, USA
Molekulare Probes, Leiden, NL
Dianove, Hamburg, D
PerkinElmer, Boston, USA

2.1.6. Analyse Kits

5-Bromo-2'-desoxy-uridine Labeling and Detection Kit 1
Deoxyribonuklease I, Amplification Grade
FASTTM DAB with metal enhancer tablet set
in situ cell death detection kit
Reagenzienkit für die HPLC-Analytik der
Katecholamine im Plasma
NanoOrange[®] Protein Quantification Kit
NEN[®] MicromaxTM TSATM Kit
Plasmid Mini Kit
QIAquick PCR Purification Kit
RNeasy MiniPräp Kit
TOPO TA Cloning[®] Kit

Roche, Penzberg, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Roche, Penzberg, D

Chromsystems, Martinsried, D
Molecular Probes, Leiden, NL
Perkin Elmer, Boston, USA
Qiagen, Hilden, D
Qiagen, Hilden, D
Qiagen, Hilden, D
Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße
Präparationsbesteck
Sterilfilter
Zellkulturgefäße

Eppendorf und Brand
Hammacher und Aesculap
Sartolab und Millipore
Falcon und Nunc

Da die verwendeten Materialien zur Standardausstattung gehören und die durchgeführten Experimente nicht beeinflussen, sind diese nur im Wesentlichen aufgeführt.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Nährmedien und Medienzusätze

Alle verwendeten Medien wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und bei 4°C gelagert. Die Nährmedien der primären Zellkultur, aber auch der Zelllinien wurden sterilfiltriert. Die Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurden autoklaviert. Medienzusätze wurden steril bei -20°C als Aliquots gelagert und kurz vor Gebrauch aufgetaut. Anschließend wurden die Supplemente, falls nicht anders beschrieben, für maximal 7 Tage bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.1. Nährmedien zur Kultivierung von Zelllinien

Bebrauchsfertige Flüssigmedien, wie DMEM und RPMI-1640 Medium wurden unter Sterilbedingungen mit den angegebenen Supplementen versetzt.

GOS-3-Zelllinie

DMEM + 10% FCS + 4 mM L-Glutamin

PC-12-Zelllinie

RPMI-1640 Medium + 1% oder 5% FCS + 2% oder 10% Pferdeserum

Kryomedium

70% DMEM bzw. RPMI -1640 Medium + 20% FCS + 10% DMSO

2.2.1.2. Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium

Zur Herstellung des flüssigen LB-Mediums für die Kultivierung von *E. coli* als Schüttelkultur, wurden 10 g Bacto Trypton, 5 g Hefeextrakt sowie 10 g NaCl in hochreinem, bidestillierten Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert unter Verwendung von 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt, und der Ansatz wurde für 20 min autoklaviert.

Agarhaltiges LB-Selektionsmedium mit Ampicillin und X-Gal

Zur Selektion einzelner Ampicillin-resistenter *E. coli* Kolonien, wurde 1 Liter LB-Medium mit 8 g Agar versetzt und anschließend autoklaviert. Der Medienansatz wurde auf 60°C abgekühlt und 1 ml einer sterilen Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml) zugegeben, um eine Endkonzentration von 50 µg/ml zu erhalten.

Unter der Sterilbank wurde das Medium gleichmäßig und zügig in Petrischalen gegossen (etwa 13 ml pro Petrischale) und bei 4°C bis zum vollständigen Aushärten gelagert. Vor Gebrauch wurden die Agarplatten bei 37°C vorgewärmt und zur weiteren Selektion mit je 40 µl einer X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml) mittels eines Drigalskispatels bestrichen. Somit konnte zwischen Bakterien unterschieden werden, die ein religiertes und denen die ein LacZ-Gen-tragendes Plasmid aufgenommen haben. Bei erfolgreichen Transformationen wurde das LacZ-Gen im Bakterium codiert. Somit kann das exprimierte Enzym β -Galaktosidase das Substrat X-Gal umsetzen und es entsteht eine Blaufärbung der wachsenden Kolonien.

2.2.1.3. Nährmedien zur Kultivierung von primären Zellkulturen

Aufgrund vorangegangener Modifikationen unterschieden sich die Medien der Präparation und der Kultivierung der primären, neuronalen Zellen geringfügig voneinander. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Medienzusammensetzungen wurden für die experimentelle Durchführung der Versuche als Standard definiert.

Das *Basismedium* wurde wie folgt angesetzt: 6,65 g/l pulverförmiges DMEM, 3,54 g/l HAM'S-F12 und 2 g/l D-Glukose wurden in hochreinem, bidestillierten Wasser gelöst. Unter der Sterilbank wurde der Ansatz mit einer Schlauchpumpe und einem Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und in 50 ml-Röhrchen aliquotiert.

Präparationsmedium

Das Medium, welches während der Präparation verwendet wurde, bestand aus dem Basismedium und 0,15 g/l Natriumbikarbonat. Dieses wurde sterilfiltriert und während der gesamten Präparation kühl gehalten.

Sammelmedium

In diesem eisgekühlten Medium wurden die präparierten Mesenzephalien gesammelt. Es setzte sich aus dem Basismedium, 0,35 g/l Natriumbikarbonat, dem Mediensupplementen N2 (1:100) und B27 (1:50), 1% FCS sowie 0,05% DNase zusammen. DNase wurde hierbei zur Vermeidung der Aggregatbildung zupipettiert, welche durch freigesetzte DNA zerstörter Zellen verursacht werden kann.

Aufnahmemedium

Nach der vollständigen Dissoziation der Mesenzephalien und der Zentrifugation bei 1200 rpm wurde das Zellpellet vorsichtig in dem Aufnahmemedium aufgenommen. Dies entsprach dem Sammelmedium ohne DNase.

Kultivierungsmedium

Das Medium bestand aus dem Basismedium sowie 2 g/l Natriumbikarbonat und variierte in der Supplementierung von Medienzusätzen. Unmittelbar nach der Präparation und Aufarbeitung wurden die primären Zellen in Kultivierungsmedium aufgenommen, welches die Medienzusätze N2 (1:100), B27 (1:50), 1% FCS sowie 20 ng/ml des Wachstumsfaktors bFGF enthielt. Nach 10 Stunden in Kultur erfolgte der erste Medienwechsel. Je nach Versuchsplanung wurden die Zellen dann mit folgenden Nährmedien kultiviert.

Für die Proliferation der Zellen wurde das Medium mit N2 (1:100) und dem Wachstumsfaktor bFGF (20 ng/ml) supplementiert. In der anschließenden Differenzierungsphase enthielt das Kultivierungsmedium N2, 1% FCS sowie L-Ascorbinsäure. Letztere wurde als Stammlösung (100 mM) supplementiert, wobei folgende Konzentrationen eingestellt wurden: ohne Zusatz (Kontrolle), 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM L-Ascorbinsäure.

2.2.1.4. Nährmedienzusätze

FCS

Fötales Kälberserum (FCS), welches bei -20°C gelagert wurde, wurde vor Gebrauch für eine Stunde bei 56°C inaktiviert, anschließend aliquotiert und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

rekombinanter humaner basic fibroblast growth factor (rh bFGF)

Lyophilisiertes bFGF-Konzentrat wurde mit einer PBS/Heparin/BSA-Lösung versetzt, um eine Stammlösung von 40 ng/µl zu erhalten. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert. Um die Aktivität des Cytokins nicht zu vermindern, wurde sie in 10 µl Aliquots bei -20°C gelagert und in einer Endkonzentration von 20 ng/ml eingesetzt.

L-Ascorbinsäure

Eine 100 mM Stammlösung wurde in hochreinem, bidestillierten Wasser hergestellt, sterilfiltriert und in 20 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

N2-Supplement und B27-Supplement

Beide Medienzusätze sind chemisch definierte Konzentrate, wobei es sich bei B27 um eine Modifikation nach Brewer *et al.* und bei N2 nach Bottenstein *et al.* handelt [Brewer und Cotman, 1989; Bottenstein und Sato, 1979]. Die Zusätze enthalten verschiedene Nährstoffe sowie Hormone, wie Insulin, Transferrin, Progesteron, Putrescin und Selenium [Brewer, 1995]. Die Medienzusätze unterstützen das Wachstum und die selektive Kultivierung primärer, embryonaler neuraler Progenitoren der Ratte. Zur Lagerung wurden diese zu je 500 µl in sterilen 1,5 ml-Eppendorfgläsern aliquotiert und bei –20°C eingefroren.

2.2.2. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Für umfassende und vergleichende Untersuchungen wurden zusätzlich neurale Zelllinien kultiviert, da das Zellreservoir primärer embryonaler Zellen limitiert war. Dazu wurde sowohl eine humane Zelllinie (GOS-3), als auch eine Zelllinie der Ratte (PC-12) eingesetzt.

2.2.2.1. Kultivierung und Subkultivierung einer GOS-3-Zelllinie

Die humane Astrozytoma/ Oligodendroglioma Zelllinie (GOS-3) wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D) bezogen [Halfter *et al.*, 1998 a und b]. Die Zellen stammen aus dem Hirntumor eines 55-jährigen Mannes und weisen in Kultur eine Verdopplungszeit von 50 Stunden auf. Des Weiteren können sie immunzytochemisch nachgewiesen werden, da die glialen Zellen das zellspezifische fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) exprimieren.

Zur Stammhaltung wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (T-75, 75 cm²) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wachsen fibroblastoid als adhärenter Monolayer in (*high*-Glukose)-DMEM, welches 10% FCS, 4 mM L-Glutamin und 4,5 g/l Glukose enthielt. Bei Erreichen der Konfluenz nach 3-4 Tagen wurde eine Passage durchgeführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit calcium- und magnesiumfreiem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin für 5 min bei 37°C inkubiert und der Monolayer abgelöst. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde durch Zusatz von 20% FCS in DMEM abgestoppt, die Zellen bei 800 rpm für 5 min abzentrifugiert und in 5 ml frischem Medium aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung wurde eine Zellkonzentration von 1·10⁶ Zellen in 25 ml Medium subkultiviert. Für die durchgeführten Experimente wurden die Zellen auf einer mit poly-L-Ornithin-beschichteten Kulturoberfläche ausgesät.

2.2.2.2. Kultivierung und Subkultivierung der PC-12-Zelllinie

Für vergleichende Untersuchungen wurde die Pheochromacytoma Zelllinie der Ratte (PC-12) kultiviert. Die immortalisierte Zelllinie stammt aus einem Nebennierentumor und exprimiert unter anderem das Katecholamin Dopamin. Daher wurde diese Zelllinie häufig als neuronales Zellmodell verwendet.

Die Zellen wurden unter gleichen Bedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) in T-75 Flaschen als Suspensionskultur in RPMI-1640 Medium expandiert, wobei 5% FCS und 10% Pferdeserum zugesetzt wurden. Bei einer Verdopplungszeit von 50-60 Stunden erreichten die Zellen nach etwa 5 Tagen die Konfluenz. Die Passage erfolgte durch vollständige Abnahme der Zellsuspension und Pelletierung bei 800 rpm für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml frischem RPMI-1640 Medium resuspendiert. Anhand der Resultate der Zellzahlbestimmung wurde eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen in 25 ml Medium subkultiviert.

Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden die Zellkulturgefäße mit Kollagen I beschichtet, um eine Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Gleichzeitig wurde der Gehalt an FCS auf 1% und die Konzentration des Pferdeserums auf 2% reduziert.

2.2.2.3. Revitalisierung der Zelllinien

Die Stammkulturen der GOS-3- sowie PC-12-Zelllinien wurden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -172°C gelagert. Die Zellen wurden zur Revitalisierung aus dem Kryotank entnommen und zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Das enthaltene DMSO, welches die Kristallbildung während der Kryopräservierung verhindert, wurde entfernt. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 10 ml-Falcon-Röhrchen transferiert und mit 5 ml vorgewärmten Medium versetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 800 rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 7 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Die Suspensionskultur wurde anschließend in eine T-25 Zellkulturflasche (25 cm²) überführt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.2.4. Kryopräservierung der Zelllinien

Zur Langzeitlagerung wurde aus der entsprechenden adhärennten GOS-3-Kultur bzw. der PC-12-Suspensionskultur eine definierte Zellkonzentration gewonnen. Durch Zentrifugation bei 800 rpm wurden die Zellen pelletiert und der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Zur Konservierung wurden die Zellen in Kryomedium (70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO) aufgenommen, so dass eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Kryoröhrchen aliquotiert werden konnte.

Diese wurden in speziellen, mit Isopropanol aufgefüllten Gefrierbehältern für etwa 24 Stunden bei -70°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einen zentralen Kryotank (-172°C) überführt.

2.2.2.5. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die zur Klonierung verwendeten „One Shot[®] Chemically Competent *E. coli*“ Zellen (TOPO TA Cloning[®] Kit) wurden auf Agarplatten oder in Flüssigmedium kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Kolben und Kulturröhrchen bei 180 rpm geschüttelt. Dabei verblieben die Kulturen im Brutraum bei 37°C .

2.2.2.6. Kryopräservation von *Escherichia coli*

Zur Langzeitlagerung wurde ein Glycerolstock der *E. coli* Zellen hergestellt. Dazu wurden 500 μl der Suspensionskultur mit 500 μl autoklaviertem Glycerol gemischt und bei -70°C gelagert.

2.2.3. Kultivierung primärer Zellen

2.2.3.1. Isolation embryonaler neuraler Progenitoren

Für die vorliegenden Studien wurden neuronale Progenitoren aus dem ventralen Mesenzephalon des Rattenembryos im Entwicklungsstadium (E12–13) post coitum präpariert. Die trächtigen Sprague Dawley Rattenweibchen (*Rattus norvegicus*; Medizinische Hochschule Hannover) wurden in einem mit Ether gesättigten Behälter analgetisiert. Anschließend wurde den Ratten Ketamin (0,9 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) und Rompun (Dihydro-Thiazin-Hydrochlorid; 0,6 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) zur länger anhaltenden Narkotisierung intraperitoneal injiziert. Die betäubten Ratten wurden mit Gummibändern fixiert und der Bauchraum mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Der anschließend entnommene Uterus wurde in gekühlten Phosphatpuffer (PBS) überführt. Die Freipräparation der Embryonen aus den sie umgebenden embryonalen Häuten, sowie weitere Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Hierzu wurden die Embryonen zunächst in Petrischalen mit gekühltem Minimal Essential Medium Hanks (MEM) + 25 mM HEPES transferiert, wo das Entwicklungsstadium anhand der Kopf-Rumpf-Länge bestimmt wurde. In frischem Präparationsmedium und mit Hilfe eines Binokulars wurden die Embryonen anschließend decapitiert.

Um das ventrale Mesenzephalon zu isolieren, wurde der Bereich des gesamten Mesenzephalons herauspräpariert und durch einen Sagitalschnitt geöffnet. Nachfolgend wurden die Meningen vom Präparat gelöst und das mesenzephalare Gewebe in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit eiskaltem Sammelmedium gelagert.

Um die neuronalen Zellen zu vereinzeln, wurden sie mit Kunststoffpipettenspitzen blasenfrei trituiert. Die dafür verwendeten Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch abgeschmolzen, um die Spitzenoberfläche abzurunden und somit die Scherkraft auf die Zellen zu minimieren (Trituierspitzen).

Im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium (E13) der Embryonen war es notwendig, die grob vereinzelte Zellsuspension zusätzlich mit Trypsin zu behandeln. Hierbei wurde dem Medium 0,01% Trypsin zugesetzt und die Zellen wurden für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch zügigen Zusatz von FCS erfolgt die Enzyminaktivierung. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde in 100 µl Aufnahmemedium mit einer Trituierspitze dissoziiert. Anschließend wurde eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durchgeführt.

2.2.3.2. Kultivierung embryonaler neuraler Progenitoren

Die isolierten neuronalen Progenitoren wurden in 37°C warmen Kultivierungsmedium aufgenommen und abhängig von der Versuchsplanung unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Um sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Zellen zu charakterisieren, wurden zwei verschiedene Kultivierungsverfahren angewendet, welche im folgenden Abschnitt erläutert werden.

Ein-Schritt-Kultivierung

Einerseits wurden die isolierten embryonalen Zellen des ventralen Mesenzephalons der Entwicklungsstadien (E11-12) sowie (E12-13) mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/cm² ausgesät, um das Proliferationspotential der Zellen zu bestimmen. Dabei erfolgte eine 6tägige Kultivierung unter Anwesenheit des Wachstumsfaktors bFGF.

Andererseits wurden die Zellen des Entwicklungsstadiums (E13) mit diesem Verfahren direkt nach der Isolation differenziert. Die Progenitoren wurden dazu nach der Präparation in serumhaltigem Medium aufgenommen und mit einer Zelldichte von durchschnittlich 250.000 Zellen/cm² homogen im Kultivierungsgefäß (6-Well-Format) ausgesät. Die Gefäßoberfläche wurde vorbereitend mit einer Matrix aus Laminin, Fibronectin und poly-L-Ornithin beschichtet. Dieses Kultivierungsverfahren wurde vorzugsweise bei Untersuchungen zur Genexpression eingesetzt, um hohe Konzentrationen an mRNA zu erzielen.

Zwei-Schritt-Kultivierung

Mit diesem Kultivierungsverfahren wurden proliferierte neurale Zellen nachfolgend zu spezifischen Zelltypen differenziert.

1. Schritt: Proliferation

Neuronale Progenitoren wurden nach der Isolation mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/cm² auf einer mit Laminin, Fibronectin und poly-L-Ornithin-beschichteten Zellkulturoberfläche ausgesät. Das Medium wurde während einer 6tägigen Vermehrung mit bFGF versetzt und im Rhythmus von zwei Tagen erneuert.

2. Schritt: Differenzierung

Zunächst wurde der konfluente Zellrasen mechanisch mit Trituierspitzen abgelöst. Nach erfolgter Zentrifugation (800 rpm für 5 min) und Resuspension wurde eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durchgeführt.

Im zweiten Kultivierungsschritt wurden die Zellen anschließend auf unterschiedlichen Kulturoberflächen in 20 µl Tropfen subkultiviert. Die Beschichtung bestand dabei aus Laminin und Fibronectin. Das minimale Medienvolumen ermöglichte die Aufkonzentrierung der geringen Zellmenge (15.000 Zellen/20 µl = 150.000 Zellen/cm²). Nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden wurden die Zellkulturgefäße mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Kulturen wurden für weitere 7 Tage unter variierenden Bedingungen inkubiert.

2.2.4. Kultivierungsbedingungen

Sowohl primäre neurale Zellkulturen als auch neurale Zelllinien (GOS-3 und PC-12) wurden unter gleichen Bedingungen auf unterschiedlichen Matrices ausgesät, wobei sich diese in den Materialien unterschieden. Zum einen wurden herkömmliche Kulturplatten aus Plastik von den Firmen Falcon und Nunc bezogen. Zum anderen wurde ein Membransystem eingesetzt, welches im Abschnitt 2.2.6. näher beschrieben ist. Dabei wurden folgende Kulturplattenformate und Volumina verwendet:

- 6-Well-Platten (9,6 cm²/well) 2,5 ml Medium
- 24-Well-Platten (1,75 cm²/well) 0,5 ml Medium

Alle Materialien wurden vor Versuchsbeginn sterilisiert. Die ausgesäten Kulturen wurden unter vergleichbaren Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und folgenden Sauerstoffkonzentrationen inkubiert: 21% O₂, 5% O₂, 2,5 ± 1% O₂. Niedrige Sauerstoffkonzentrationen konnten in den Cytoperm 2 Inkubatoren durch Einstromen von Stickstoffgas eingestellt und über integrierte Gassonden reguliert werden.

2.2.5. Beschichtungen der Zellkulturoberflächen

Die Beschichtung der Plastik- und Membranoberflächen erfolgte in Anlehnung an die Protokollangaben des Herstellers am Tag vor der Versuchsdurchführung und wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

poly-L-Ornithin

Die Kulturoberfläche konnte direkt mit der Matrix überschichtet werden. Sollten verschiedene Matrices kombiniert werden, so war die poly-L-Ornithin-Lösung als Basis anstelle von PBS zu verwenden.

Laminin

Zur Beschichtung wurden bei -20°C gekühlte Pipettenspitzen sowie ein Kühlblock verwendet, um eine frühzeitige Anheftung der Matrix zu verhindern. Das Laminin wurde in 4°C kaltem PBS so verdünnt, dass die Kulturoberflächen mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschichtet wurden. Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur unter der Sterilbank über Nacht inkubiert. Vor Gebrauch wurde der verbleibende Überstand abgesaugt und die Oberfläche zur Neutralisierung mit autoklaviertem bidestillierten Wasser zweimal gewaschen.

Fibronektin

Das lyophilisierte Fibronektin wurde in 1 ml sterilem bidestillierten Wasser vollständig gelöst und als sterile Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Zur Beschichtung wurde die Stammlösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aufgetaut und mit gekühltem PBS auf eine Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ verdünnt. Nach der Inkubation über Nacht erfolgt die Neutralisation mit sterilem bidestillierten Wasser. Fibronektin wurde in den dargestellten Versuchen immer in Kombination mit Laminin oder mit Laminin/poly-L-Ornithin verwendet.

Kollagen I

Zur Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen wurde die Matrix mit steriler Essigsäure (0,02 N) verdünnt, um eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu erreichen. Die Kulturoberfläche wurde gleichmäßig mit der Matrixlösung überschichtet, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und nachfolgend einmal mit sterilem bidestillierten Wasser zur Säurebeseitigung gewaschen.

2.2.6. Das bioFolie-Membransystem

In der Nachwuchsforschergruppe Organ- und Gewebekultur der GBF Braunschweig wurde aufbauend auf vorangegangene Entwicklungen von Professor Augustinus Bader in Zusammenarbeit mit den Zentralen Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) das verwendete Membransystem angefertigt (Abb. 2.1.). Das System wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt (DPMA) patentiert [Bader A., 2002]. Die Abb. 2.2. zeigt die einzelnen Komponenten aus denen das bioFolie-Membransystem besteht. Die Grundform bildet eine 24-Well-Kulturplatte, welche aus Polyetherimid (PEI) besteht. Die Kulturgefäßoberfläche wurde durch die fest eingespannte Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran (bioFolie; vivascience AG) gebildet. Zur Abdichtung des Systems wurde eine Silikondichtung von 2 mm Dicke durch eine Metallplatte fest angedrückt. Dabei sorgen 14 Schrauben für die Fixierung des gesamten Systems. In zusammengebautem Zustand wurde das Kulturgefäß autoklaviert und vor Gebrauch mit einem sterilen Plastikdeckel der Firma Nunc verschlossen. Ein Basisgestell, auf dem das System während der Inkubationszeit gelagert wurde, sorgt für eine uneingeschränkte Gasdiffusion über die bioFolie, da es einen Abstand von etwa 1 cm zum Kulturboden schafft.

Das in Abb. 2.3. dargestellte Schema zeigt den prinzipiellen Aufbau sowie die Gasdiffusion durch die Membran, welche mit einer Schichtdicke von 25 µm folgende technische Daten aufweist:

Schmelzpunkt	260°C – 280°C
Sauerstoffindex	95
Gasdurchlässigkeiten	CO ₂ : 25,9 x 10 ³ cm ³ /m ² x d
	O ₂ : 11,6 x 10 ³ cm ³ /m ² x d

Des Weiteren weist die bioFolie eine hohe Transparenz auf und ist chemisch inert. Außerdem ist sie gut mikroskopierbar, da die Membran keine Eigenfluoreszenz zeigt und somit für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist. Für immunzytochemische Analysen wurde die auf der Membran adhärent wachsende Kultur mit einem Skalpell ausgeschnitten, und konnte in eine herkömmliche Multiwellplatte oder auf einen Objektträger transferiert werden.



Abb. 2.1. Das **bioFolie-Membransystem** in montiertem Zustand mit Plastikabdeckung.

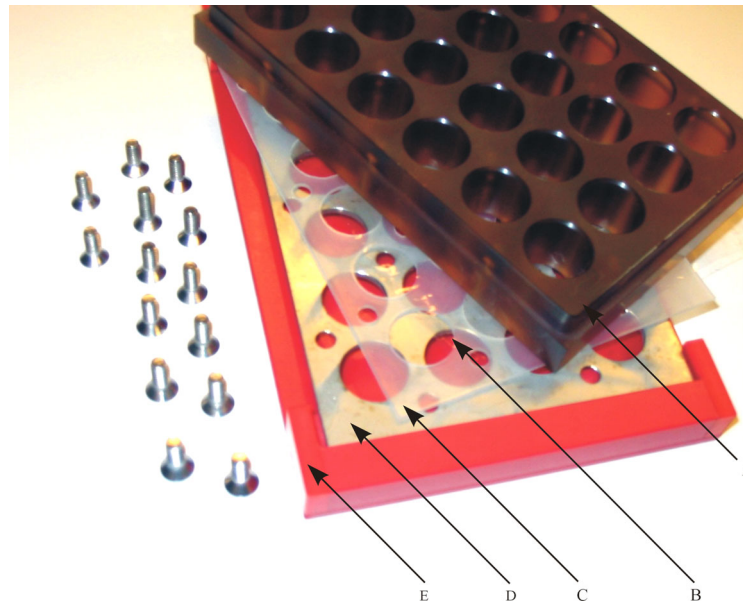


Abb. 2.2. Darstellung der einzelnen **Komponenten des Membransystems**. (A) 24-Well-Plattenformat aus Polyetherimid (PEI), (B) Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran (bioFolie) (vivascience AG, Hannover, D), (C) Silikondichtung, (D) Metallplatte, (E) Basisgestell.

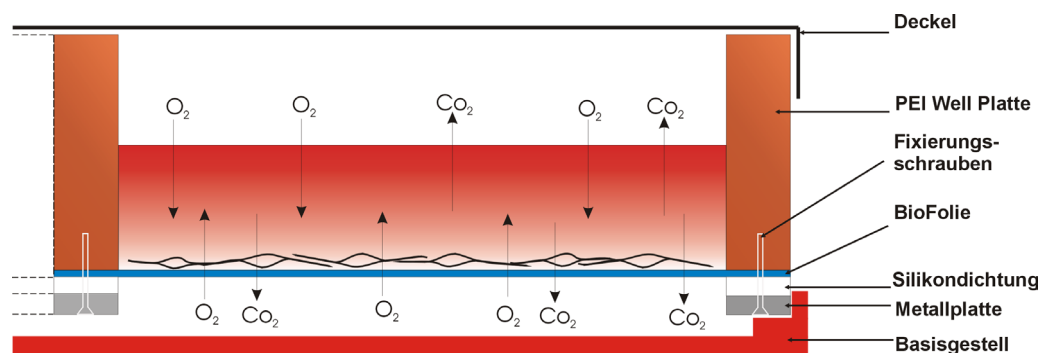


Abb. 2.3. **Prinzip der Gasdiffusion** in einem Well des Membransystems. Gekennzeichnet sind die einzelnen Komponenten sowie die Gasdiffusion durch das Medium und die bioFolie. Sauerstoff diffundiert durch das Medium sowie die gaspermeable Membran und übt somit einen oxidativen Stress auf die Zellen aus.

Gleiche Eigenschaften weist die petriPERM-Zellkulturschale auf, deren Zellkulturoberfläche ebenfalls die bioFolie-Membran bildet und von der vivascience AG bezogen wurde (Abb. 2.4.). Das Zellkulturgefäß im 6-Well-Format wurde verwendet, um höhere Zellkonzentrationen zur Genexpressionsanalytik auszusäen. Außerdem ist es für die immunzytochemischen Markierungen apoptotischer Zellen besser handhabbar.

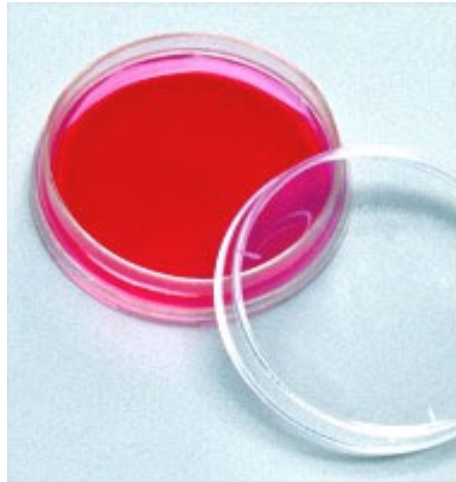


Abb. 2.4. **petriPERM-Zellkulturschale** mit einer gasdurchlässigen Zellkulturoberfläche (bioFolie).
(Quelle: http://www.vivascience.de/de/cell_products/petriperm/petriPERM.shtml)

Aufgrund der beschriebenen Konstruktion und Eigenschaften des bioFolie-Membransystems wurde deutlich, dass die Zellkulturen auf zwei Wegen mit Sauerstoff versorgt werden. Einerseits über die Diffusion durch das Medium, wobei die Sauerstoffkonzentration abhängig von der Gaslöslichkeit im Milieu ist. Andererseits diffundiert Sauerstoff direkt durch die gasdurchlässige bioFolie-Membran und kann somit die Zellen beeinflussen.

2.3. Analytik

2.3.1. Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Unter Verwendung einer Trypanblau-Lösung sowie der Zählkammer nach Neubauer wurde sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zellvitalität bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau ist sehr hydrophil und kann ausschließlich die Plasmamembran toter oder sterbender Zellen durchdringen. So konnten die ungefärbten lebenden Zellen und die spezifisch blau gefärbten toten Zellen differenziert werden.

2.3.2. Analyse der Glukose- Laktatkonzentrationen

Zur Bestimmung dieser beiden Parameter in gesammelten, frischen Kulturüberständen wurde ein Biochemischen Analysator [YSI 2700 select, Yellow Springs Instruments, Ohio, USA] verwendet. Das Prinzip der Analyse beruht auf einem enzymatisch-elektrochemischen Prozess, bei dem enzymatisch gebildetes H_2O_2 von nachgeschalteten Pt/Ag-AgCl Elektroden amperometrisch detektiert wurde. D-Glukose sowie L-Laktat werden auf einer integrierten enzymbeschichteten Membran, unter Beteiligung von Sauerstoff, durch die immobilisierten Enzyme Glukose- und Laktatoxidase zu H_2O_2 oxidiert. Zur Kalibrierung des Analysators wurden Eichlösungen definierter Laktat- und Glukosekonzentration (2,5 g/l Glukose; 0,5 g/l Laktat) eingesetzt, um eine simultane Messung zu gewährleisten.

2.3.3. Quantifizierung der Katecholamine

Die Etablierung der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) zur elektrochemischen Detektion der Katecholamine ist ein wichtiger Schritt, um das physiologische Potential der generierten Dopaminneurone bestimmen zu können.

2.3.3.1. Extraktion der Katecholamine

Stabilisierungslösung:

900 mg EGTA und 700 mg Glutathion wurden in 8 ml 0,5 N NaOH gelöst und mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,0-7,5 eingestellt; anschließend wurde die Lösung auf 10 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Zur Extraktion der zu bestimmenden Katecholamine aus dem Medienüberstand der Kulturen wurde der Chromsystems Reagenzienkit für die HPLC-Analytik der Katecholamine im Plasma verwendet. Es wurde je 1 ml Probe sofort nach der Entnahme in ein

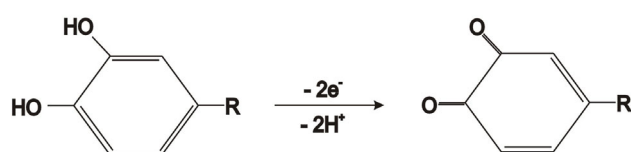
1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt, in das zuvor 20 µl einer Stabilisierungslösung vorgelegt wurden. Die so aufbereiteten Proben wurden bis zur Extraktion bei -20°C gelagert. Die Durchführung erfolgte nach den Protokollangaben des Herstellers und wurde hier in Kürze beschrieben. Das Prinzip der Isolation beruht auf einer selektiven Adsorption der Katecholamine an Aluminiumoxid aus der Probe.

Die Probenkartuschen (*Sample Clean up Column*) wurden mit 0,5 ml Extraktionspuffer befüllt, das enthaltene Aluminiumoxid wurde aufgeschüttelt und je 1 ml Probe dazu pipettiert. Zur späteren Auswertung wurden zusätzlich 50 µl eines internen Standards supplementiert (12 pg/µl DHBA). Die Kartusche wurde verschlossen, für 10 min über Kopf geschüttelt und anschließend wurde der Überstand mit einer Pumpe abgesaugt. Die im Säulenmaterial und Aluminiumoxid gebundenen Katecholamine wurden nun dreimal mit je 1 ml Waschpuffer von Rückständen des Extraktionspuffers befreit. Danach wurden 120 µl Elutionspuffer aufgetragen, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in ein Probengefäß abzentrifugiert. Etwa 40 µl des Eluats wurden direkt in das HPLC-System injiziert.

2.3.3.2. HPLC-System mit elektrochemischer Detektion zur Quantifizierung der extrahierten Katecholamine

Das HPLC-System besteht aus einer Pumpe (Model 52x), einem Säulenthmostat (Model 582), einem Autosampler (Model 465) (alle Komponenten der Firma Kontron, Neufahrn, D), einer Vor- und Trennsäule (Nucleosil 100-5-C18, 250 x 4.6 mm, Chromsystems, Martinsried, D) sowie einem elektrochemischen Detektor der Firma Biometra, welcher eine Glas-Karbon-Arbeits Elektrode enthält. Das gesamte System wurde mit Hilfe der KromaSystem 2000 Software über einen Computer und ein Multiport gesteuert. Bei der hier angewendeten Methode der Flüssigkeitschromatographie besteht der Detektor aus einer Drei-Elektroden-Messzelle (Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode).

Das Prinzip beruht auf der Potentialmessung zwischen der Referenz- und Arbeits-elektrode, welches durch Oxidations- und Reduktionsreaktionen entsteht. Für die Detektion der Katecholamine gilt folgende grundsätzliche Reaktion:



Durch die Optimierung des Systems wurden folgende Einstellungen für die Analytik der dargestellten Arbeit verwendet: Arbeitspotential von 600 mV; Detektionsbereich bis zu 2 nA; Flussrate von 1ml/min.

2.3.3.3. Auswertung der gemessenen Daten des HPLC-Systems

Die Analytik erfolgte durch die Integration der Peakflächen und der Mitführung eines Kalibrationsstandards in jeder Probenserie. Zuvor wurde ein Kalibrationschromatogramm erstellt, um sicher zu gehen, dass sich das System äquilibriert hat und die Retentionszeiten stabil sind. Zusätzlich wurde ein interner Standard (DHBA) in die Auswertung einbezogen, um Verluste, die bei der Probenvorbereitung auftreten können, zu kompensieren.

Folgende Berechnungsformel wurde zur Quantifizierung verwendet:

$$C_{Pr} = \frac{Kat_{Pr} \times IS_{St}}{Kat_{St} \times IS_{Pr}} \times Faktor$$

- C_{Pr} ist die Konzentration in der Probe (in pg/ml)
- Kat_{Pr} ist die Peakfläche des zu bestimmenden Katecholamins im Chromatogramm der Probe
- Kat_{St} ist die Peakfläche des zu bestimmenden Katecholamins im Chromatogramm des Kalibrationsstandards
- IS_{Pr} ist die Peakfläche des internen Standards im Chromatogramm der Probe
- IS_{St} ist die Peakfläche des internen Standards im Chromatogramm des Kalibrationsstandards
- Der Faktor ergibt sich aus den Verdünnungen der Probenvorbereitung und gilt wie folgt: Noradrenalin (600), Adrenalin (300), Dopamin (300).

2.4. Immunzytochemische Markierung

Lösungsansätze:

PBS (10x)	90 g NaCl, 1,22 g Na ₂ HPO ₄ , 8,15 g KH ₂ PO ₄ , ad 1000 ml H ₂ O; pH-Wert 7,4 mit 1 N NaOH einstellen und filtrieren
4% PFA-Lösung	4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS geben und bei 55°C mindestens eine Stunde rühren; klare Lösung in Eiswasser überführen, über Faltenfilter filtrieren und Aliquots bei -20°C lagern
DAPI Stammlösung	1 mg/ml 4'-6-Diamino-2-Phenylindole wurde in hochreinem bidestillierten Wasser gelöst und bei 4°C gelagert

2.4.1. Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Assay

Zur Charakterisierung der primären neuronalen Zellkultur hinsichtlich der Proliferationsrate wurde der *5-Bromo-2'-desoxy-uridine (BrdU) Labeling and Detection Kit 1* der Firma Roche verwendet. Die Kultur wurde während der Proliferationsphase mit einem BrdU-Markierungsreagenz (10 µM) versetzt und für 30 min inkubiert. Dabei wurde anstelle des Thymidins BrdU (Pyrimidin Analogon) während der S-Phase der sich teilenden Zellen in die DNA eingebaut. Anschließend wurden die Zellen mit 70% (v/v) Ethanol fixiert, für weitere 30 min bei -20°C inkubiert und wiederholt mit Waschpuffer gespült. Das eingebaute BrdU wurde nun mit einem spezifischen Antikörper immunzytochemisch detektiert. Dazu wurde der primäre Antikörper (Maus anti-BrdU) in der speziellen Arbeitslösung verdünnt, auf die Kultur aufgetragen und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im letzten Schritt wurde anti-BrdU mit fluoreszierendem Cy3 (anti-Maus) konjugiert und somit detektiert.

2.4.2. Immunzytochemische Markierung spezifischer neuraler Zelltypen

Die Fixierung erfolgt durch einstündige Überschichtung der Zellkultur mit Paraformaldehyd (PFA) -Lösung. Dabei sind die Arbeitsschritte sehr vorsichtig durchzuführen, um ein Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellkulturen dreimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen.

Im Anschluss wurde die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegen Serum sowie die Permeabilisierung der Zellwände mit Hilfe von Triton durchgeführt. Dazu wurde das Ziegen Serum in einer PBS /0,3% Triton X-100-Lösung 1:4 verdünnt und für 30 min auf die Zellkultur gegeben.

Die anschließende Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Kulturen wiederholt mit PBS gewaschen und zur Detektion mit dem sekundären Antikörper (Cy3 oder Alexa 488) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit 4'-6-Diamino-2-Phenylindole (DAPI) durchgeführt, um Auswertungen spezifischer Markierungen auch auf die Zellzahl beziehen zu können. Der DAPI-Fluoreszenzfarbstoff interagiert mit den AT-Gruppen in der kleinen Furche (*minor groove*) der DNA und macht den Zellkern durch Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 359$ nm oder 461 nm sichtbar. Der Farbstoff wurde in Kombination mit dem sekundären Antikörper in einer Konzentration von 0,1 µg/ml supplementiert und für eine Stunde inkubiert.

Die Platten wurden zur längeren Lagerung mit 0,05%iger Natriumazidlösung überschichtet oder gegebenenfalls in Glyceringelatine eingebettet.

Antigen	TH	TuJ1	GFAP	MAP2
Spezifität	TH-positive (dopaminerge) Zellen	Neurone	Astrozyten	Neurone
Primärer Antikörper	Maus anti-Ratte IgG ₁	Kaninchen anti- Ratte IgG _{2a/k}	Kaninchen anti- Rind	Maus anti-Ratte IgG ₁
Verdünnung	1:100	1:50	1:600	1:200
Sekundärer Antikörper	goat anti-Maus IgG Cy3 gekoppelt	goat anti- Kaninchen IgG Alexa 488 gekoppelt	goat anti- Kaninchen IgG Alexa 488 gekoppelt	goat anti-Maus IgG Cy3 gekoppelt
Verdünnung	1:200	1:150	1:150	1:200

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten **primären und sekundären Antikörper**.

2.4.3. Immunzytochemische Markierung apoptotischer Zellen

Lösungsansätze:

Blockierungslösung:	3% H ₂ O ₂ in Methanol unter dem Laborabzug mischen
Permeabilisierungslösung:	0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat-Lösung mischen
TUNEL-Reagenz:	Enzymlösung 1:10 in der Markierungslösung verdünnen
DAB Substrat /Verstärker	0,5 mg/ml DAB, 0,2 mg/ml Kobalt Chlorid, 0,3 mg/ml Urea Hydrogen Peroxid, 0,05 M Tris Puffer, 0,15 M NaCl (Tabletten) in 5 ml bidestilliertem Wasser ansetzen und filtrieren

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurde ein *in situ cell death Detection* Kit der Firma Roche eingesetzt, welcher alle notwendigen Substanzen enthält. Das Prinzip des TUNEL (*TdT-dependent dUTP nick end labeling*)-Tests beruht auf der Markierung der DNA-Strangbrüche, die während der Apoptose durch aktivierte Endonukleasen entstanden sind [Gavrieli *et al.*, 1992]. Durch Zugabe von terminaler Desoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) wurden FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-markierte Nukleotide an die freien 3'-Enden der DNA-Fragmente gehängt. Die so markierten apoptotischen Zellen wurden durch eine folgende immunzytochemische Färbung sichtbar gemacht. Die Markierung wurde mit Hilfe des Herstellerprotokolls durchgeführt und ist im Folgenden kurz beschrieben.

Die mit PFA fixierten Kulturen wurden für 10 min bei Raumtemperatur mit 3% H₂O₂ in Methanol blockiert und anschließend einmal mit PBS vorsichtig gewaschen. Die Permeabilisierungslösung wurde aufgetragen und für 2 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde das TUNEL-Reagenz zugegeben. Dabei wurde der zu markierende Bereich mit einem Deckgläschen abgedeckt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen und ein Austrocknen während der Inkubation bei 37°C für eine Stunde zu verhindern. Eine Signalverstärkung konnte mit einem Peroxidase-konjugierten anti-FITC Antikörper (Schaf) erreicht werden. Das Enzym ist in der Lage ein geeignetes Substrat, wie DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) zu präzipitieren. So konnte die Kultur lichtmikroskopisch ausgewertet werden, wobei Kontrollen durch die Vorbehandlung mit 3 U/ml DNase I (positiv) oder dem Entzug der Desoxyribonukleotidyl-Transferase (negativ) angefertigt wurden.

2.4.4. Doppelmarkierungen

Lösungsansatz:

Fast Red Substrat es wurden 2 mg Naphthol AS-MX Phosphat in 0,2 ml Dimethylformamid gelöst und in 10 ml Tris-HCl Puffer pH-Wert 8,2 überführt; 10 mg Fast Red TR Salz und 2,4 mg Levamisol (Inhibitor endogener alkalischer Phosphatase) wurden erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Um vergleichende Untersuchungen durchzuführen und detaillierte Aussagen über die Kulturen treffen zu können, wurden überwiegend Doppelmarkierungen durchgeführt. Dabei wurde wie in Abschnitt 2.4.3. beschrieben vorgegangen. Jedoch wurden zwei primäre Antikörper unterschiedlicher Spezies (z.B. Maus anti-TH und Kaninchen anti-TuJ1) auf die Kultur aufgetragen, und mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff (z.B. anti-Maus gekoppeltes Cy3 und anti-Kaninchen gekoppeltes Alexa 488) detektiert. Um eine zweite immunzytochemische Färbung neben der Apoptose-Detektion durchführen zu können, wurde nach dem TUNEL-Reagenz ein zweiter primärer Antikörper (Maus anti-TH oder -TuJ1) aufgetragen. Dieser wurde anschließend mit einem zweiten Enzymgekoppelten Antikörper erkannt. Hierbei wurde eine alkalische Phosphatase verwendet, welche an einen Ziege anti-Maus Antikörper gebunden ist. Das Enzym wurde durch eine Substratreaktion mit Fast Red detektiert, welche zu einer tief roten Färbung führt.

2.4.5. Auswertung immunzytochemischer Markierungen

Die Analytik aller angefertigten immunzytochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Auflicht- und Fluoreszenzmikroskops (Model Axiovert100) sowie einer Digitalkamera (Model Axio Cam HRc) der Firma Zeiss.

Um eine quantitative Aussage über die immunreaktiven Zellen (TH^+ , TuJ1^+) treffen zu können, wurde ein definierter Zählbereich festgelegt. Die Methode ist in der Diplomarbeit von Michael Wiehle detailliert beschrieben worden [Wiehle, 2002]. Die Mitte der Kultur wurde fokussiert und bei einer 40fachen Vergrößerung mit Hilfe eines Zählgitters vertikal ausgezählt. Im Gegensatz dazu wurde die Markierung apoptotischer Zellen in zufällig ausgewählten Bereichen ($0,1 \text{ mm}^2$) analysiert. Dabei wurden jeweils 10-mal $0,1 \text{ mm}^2$ pro 6-Well ausgewertet. Die Kernfärbung gilt dabei immer als Gesamtzellzahl des ausgewerteten Bereichs.

2.5. Molekularbiologische Methoden

Lösungsansätze:

Tris-Acetat-Puffer (TAE) (50x)	2 M TRIZMA Base, 1 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, ad 1 l Wasser, pH 8.0 mit Eisessig einstellen
TE-Puffer (10x)	0,1 M Tris-HCl, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 einstellen, ad 1 l Wasser, autoklavieren
Ladepuffer (5x)	15% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) SDS, 50 mM EDTA, 0.3% (w/v) Bromphenol Blau, 0.3% (w/v) Xylen Cyanol, ad 20 ml Wasser
Ethidiumbromid - Stocklösung:	100 mg Ethidiumbromid in 250 ml bidestilliertem Wasser lösen
DEPC-Wasser	1 l bidestilliertes Wasser mit 100 µl Diethylpyrokarbonat versetzten, über Nacht inkubieren und anschließend autoklavieren
DNA-Längenstandard XIV	Konzentration 250 µg/ml

2.5.1. RNA-Isolation mittels RNeasy MiniPräp Kit

Ziel war es, eine semiquantitative Aussage über die entwicklungsabhängige Veränderung des Expressionsprofils embryonaler neuronaler Zellen treffen zu können.

Bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ wurde die Isolation der RNA aus neuronalen Zellen mit Hilfe des RNeasy MiniPräp Kit durchgeführt. Die angegebenen Puffer (RLT, RW1, RPE) sind im Reaktionsset enthalten. Dazu wurden neuronale Progenitoren (E11-12) über sieben Tage differenziert und durch die anschließende RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) analysiert.

Zur Gewinnung der RNA wurde nach 1, 2, 3, 5 und 7 DIV ein Teil der Kultur (75.000 Zellen) mit 350 µl RLT-Puffer lysiert, mit β -Mercaptoethanol zur Stabilisierung versetzt und anschließend bei -70°C gelagert. Nachdem alle Proben über sieben Kulturtage gesammelt worden sind, erfolgte die RNA-Isolation nach Anleitung des Herstellers. Es war darauf zu achten, dass alle Arbeitsschritte mit RNase-freien Chemikalien und Materialien durchgeführt werden. Zunächst wurden die Zelllysate aufgetaut und für 1 min mit dem Ultraturrax (Model T25) vollständig homogenisiert. Danach wurden 700 µl 70% (v/v) Ethanol zugesetzt und die Proben auf eine RNeasy mini spin Säule überführt. Es folgt die Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 s. Die an dem Säulenmaterial gebundene RNA wurde mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen und bei 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Die Säulen wurden zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen. Dabei wurde im ersten Waschschrift erneut bei 10000 rpm für 15 s, im zweiten Schritt jedoch bei 16000 rpm für 2 min abzentrifugiert.

Nachdem die Säulen trocken waren und auf neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt wurden, erfolgte die Eluation der RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser und Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 s. Die präparierte RNA wurde, wenn nicht anders beschrieben bei -70°C gelagert. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 6 µl des RNA-Eluats eingesetzt.

2.5.2. RNA-Isolation mittels Trizol-Aufreinigung

Um RNA aus größeren Zellmengen von $>1 \cdot 10^7$ an neuronalen Zellen zu isolieren, wurde das Trizol-Reagent verwendet. Die gewonnenen RNA-Proben wurden anschließend zur Analytik der Genexpression unter Nutzung der DNA-Mikroarray Technologie eingesetzt. Isolierte Progenitoren des ventralen Mesenzephalons (E12-13) wurden in petriPERM-Kulturschalen sowie herkömmlichen Multiwellplatten (6-Well-Formate) direkt differenziert (*Ein-Schritt-Kultivierung*). Zur RNA-Isolation wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml Trizol-Reagent zur Lyse überschichtet. Während einer Inkubationszeit von 15 min wurden die adhärennten Zellen mehrfach abgespült und dissoziiert. Anschließend wurde je ein 1 ml des Zelllysats in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und mittels Ultraturrax (Model T25) aufgeschlossen. Die Proben wurden mit 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol versetzt, um die RNA von Proteinen und DNA zu separieren und für 15 s kräftig geschüttelt. Es folgt eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur sowie die Zentrifugation bei 4°C und 11000 rpm für 15 min zur vollständigen Phasentrennung. Die wässrige obere Phase wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Es ist darauf zu achten, dass keine Verunreinigungen durch die organische Phase oder Interphase verursacht werden, da hier Proteine bzw. genomische DNA vorliegen. Zur RNA-Fällung wurden die Proben nun mit 500 µl Isopropanol versetzt, kurz geschwenkt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Pelletierung erfolgt durch Zentrifugation bei 4°C und 11000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet und in je 10-20 µl DEPC-Wasser gelöst. Die quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mittels photometrischer Messung durchgeführt.

2.5.3. Quantifizierung der isolierten RNA/DNA

Um Qualität und Quantität isolierter RNA- und DNA-Proben zu bestimmen, nutzte man das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Um den Proteingehalt und damit die Reinheit zu ermitteln, wurden die Proben zusätzlich bei 280 nm gemessen. Es wurde ein Spektrophotometer (Model Ultraspec 3300pro) verwendet. Die optische Dichtemessung von TE-Puffer stellte den Nullwert der Messungen dar. Die RNA- bzw. DNA-Proben wurden entsprechend in TE-Puffer verdünnt, so dass eine Messung im linearen Bereich gewährleistet werden konnte.

Ermittelt man das Verhältnis A_{260}/A_{280} so ergibt sich der Reinheitsgrad der Proben, welcher mindestens 1,7 betragen sollte. Folgende Werte dienten als Grundlage für die Konzentrationsberechnung:

DNA-Quantifizierung:	1 OD = 50 µg/ml
RNA-Quantifizierung:	1 OD = 40 µg/ml

2.5.4. DNase-Verdau

Zur Vorbereitung der isolierten RNA-Proben für die RT-PCR erfolgt ein DNase (Desoxyribonuklease I)-Verdau laut Angaben des Herstellers. Der Verdau wurde mit dem Ziel durchgeführt, einzel- und doppelsträngige DNA-Verunreinigungen zu Oligodeoxyribonukleotiden mit einem 5'-Phosphat Ende zu verdauen.

Reaktionsansatz:

1 µg RNA Probe
1 µl 10x DNase I Reaktionspuffer
1 µl DNase I (1 U/µl)
ad 10 µl DEPC-behandeltes Wasser

Der Ansatz wurde in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch den Zusatz von 1 µl einer 25 mM EDTA-Lösung und der Erhitzung auf 65°C für 10 min im Thermomixer. Die so vorbehandelte RNA-Probe konnte nun für die cDNA-Synthese weiterverwendet werden.

2.5.5. Reverse Transkription (RT)

Um die zu untersuchenden Zielgene zu amplifizieren, wurde die messenger RNA (mRNA), deren zellulärer Anteil bei insgesamt 1-2% liegt, im ersten Schritt der RT-PCR durch eine SuperScript II Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde die reverse Transkription mit einem spezifischen (dT)₁₈-Primer durchgeführt. Der Primer hybridisiert an das 3'-PolyA-Ende der mRNA, so dass komplementär zur mRNA mittels reverser Transkriptase der cDNA-Einzelstrang verlängert wurde. Es entstand ein RNA-cDNA-Hybrid, welcher denaturiert wurde und als einzelsträngiges Template für die anschließende PCR vorliegt.

Folgende Volumina wurden für die Reaktionsansätze pipettiert:

Reagenz	Stammlösung	RNA aus RNeasy Mini Präp Kit	RNA aus Trizol-Isolierung
RNA	6 µl (=X ng)	1 µl (=100 ng)	
Oligo-(dT) ₁₈ Primer	100 pM/µl	2 µl	2 µl
dNTP-Mix	2,5 mM	1 µl	1 µl
DEPC-Wasser		3 µl	8 µl
RNasin RNase Inhibitor	40 U/µl	1 µl	1 µl
First Strand Puffer	5x	4 µl	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl	2 µl	
SuperScript II RT	200 U/µl	1 µl	1 µl

Die RNA-Probe wurde zunächst mit dem Oligo-(dT)-Primer und dem dNTP-Mix gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C im Thermomixer denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es folgte der Zusatz von 4 µl First Strand Puffer, 2 µl DTT sowie 1 µl RNasin. Die Reaktionsgefäße wurden für 2 min bei 42°C vorinkubiert, um optimale Reaktionsbedingungen für das Transkriptionsenzym zu schaffen. 1 µl der reversen Transkriptase (Superscript II) wurde zum Ansatz pipettiert, welcher dann für 50 min bei 42°C im Thermoblock verblieb. Das Enzym wurde nach Abschluss der Synthese bei 70°C für 10 min inaktiviert. Die cDNA-Proben wurden der PCR entweder sofort zugeführt oder bei -20°C gelagert.

2.5.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation der cDNA mit einer hohen Ausbeute. Dabei erfolgt die Bindung und Verlängerung komplementärer, spezifischer Oligonukleotid Primer, welche an die spezifischen Basensequenzen der einzelsträngigen cDNA binden. Die in diesen Untersuchungen eingesetzten Primer wurden unter Verwendung der *primer3*-Software erstellt und flankieren am 5'- und 3'- Ende den zu amplifizierenden cDNA-Bereich. Die Syntheserichtung beider Primer ist dabei gegeneinander gerichtet.

Der Ablauf eines Standardreaktionszyklus setzt sich wie folgt zusammen:

1. Denaturierung

Der doppelsträngige RNA-cDNA-Hybrid wurde durch eine Denaturierung bei 95°C für 30 s in zwei Einzelstränge aufgetrennt.

2. Primer-Bindung (*Annealing*)

Die Primer binden an die resultierenden Einzelstränge. Dies ist ein wichtiger Schritt bezüglich der Sensitivität und der Spezifität der PCR. Die Regulierung der Annealing-Temperatur (T_A) der Primer, das Design der Primer sowie die Zusammensetzung der Reaktionslösung spielen eine wesentliche Rolle und müssen für jede PCR neu optimiert werden. Die spezifische T_A wurde für 30 s eingestellt.

3. Synthese

Eine thermostabile DNA-abhängige Polymerase (Ex Taq Polymerase aus *Thermus aquaticus* isoliert) bindet an den durch spezifische Primer und synthetisierter cDNA gebildeten kurzen Doppelstrang, und beginnt mit der DNA-Synthese (72°C für 30 s).

Jeder Zyklus wurde durch eine initiale Denaturierung bei 95°C für 1 min eingeleitet, um Proteine zu inaktivieren und eine vollständige Trennung des DNA-Doppelstranges zu erzielen. Die finale Inkubation bei 72°C für 10 min schließt den Zyklus. Die zu analysierenden, spezifischen DNA-Abschnitte wurden durch Wiederholung der Zyklen exponentiell amplifiziert.

Der PCR-Ansatz wurde wie folgt in ein steriles 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, wobei alle Komponenten auf Eis zu lagern waren:

2 µl cDNA
 1 µl Forward (FW) Primer (100 pM/µl)
 1 µl Reverse (RV) Primer (100 pM/µl)
 5 µl dNTP-Mix (2,5 mM)
 5 µl 10 x Ex Taq Reaktionspuffer
 35,8 µl steriles bidestilliertes Wasser
0,2 µl Ex Taq Polymerase
50 µl Endvolumen

Mit dem Zusatz der Taq-Polymerase wurde die Reaktion sofort gestartet. Dabei unterschieden sich die Temperaturprofile der PCR lediglich durch die spezifische Annealing Temperatur der jeweiligen Primer (Tabelle 2).

Spezifischer Primer	Primersequenz 5' - 3'	T _A	Zyklenzahl
GAPDH (FW) GAPDH (RV)	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	59 °C	24/25
TH (FW) TH (RV)	AAA ACC CTC CTC CTT GTC TC ATC TCT TCC GCT GTG TAT TCC	57°C	30/31
GFAP (FW) GFAP (RV)	AAA TCC CTT CCT TCA TCC TTG TTG TTA CCC CCT CTC CGC ATC CAT ACT TAG	59 °C	30/31
Nestin (FW) Nestin (RV)	CTG GGG GAG GAA AGT GTG AAG G AGG TAG AGG CCC AGG GGA GTA GAG	59 °C	33
NFm (FW) NFm (RV)	CCC GAG AAA GCC AAG TCC CCT GTG TCG CCT CCC TCG CTG GTG ATT TTT	64 °C	33

Tabelle 2 **Spezifische Primersequenzen** der Zielgene, deren Annealing-Temperatur (T_A) sowie Zyklenzahl zur Amplifikation.

Um die Daten der PCR semi-quantitativ bewerten zu können, wurde das *housekeeping*-Gen Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die zu vergleichenden Proben wurden auf gleiche GAPDH-Bandenstärken eingestellt. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Produkte auf ein 1,5%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen.

2.5.7. Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine einfache und wichtige Methode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten dar. Sie wurde zur Trennung doppelsträngiger DNA verschiedener Molekulargewichtsbereiche von 200-50.000 bp (Basenpaare) eingesetzt. Dazu wurde Agarose (1,5% w/v in 1xTAE-Puffer) in einer Mikrowelle aufgekocht, und nach dem Abkühlen auf 60°C in die Gelkammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde nun in die Elektrophoreseapparatur überführt und mit 1xTAE Puffer bedeckt. Jede Probe wurde mit ¼ Volumen 5x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen (auf der Kathodenseite) pipettiert. Die Größe linearer DNA-Fragmente wurde durch parallel aufgetragene Längenstandards (100 bp-5000 bp) bestimmt. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt und die DNA nach Bestrahlung mit UV-Licht über Fluoreszenz visualisiert und fotografiert.

2.6. Quantitative *Real Time* PCR

2.6.1. Das Prinzip der *Real Time* PCR

Im folgenden Abschnitt wurde auf die Etablierung der quantitativen *Real Time* PCR für die Analytik der Genexpression im neuronalen Zellsystem eingegangen. Die Methode wurde ausgewählt, da die LightCycler Technologie derzeit die genaueste Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung geringer Konzentrationen an mRNA ist. Dabei liegen die Vorteile in dem schnellen Reaktionsverlauf und einer zeitgleichen Visualisierung der Reaktionen am Computer. Ein Nachteil ist jedoch darin zu sehen, dass auch unspezifische PCR-Produkte sowie Primer-Dimere entstehen können.

Bei diesem Verfahren wurde die herkömmliche PCR mit einer fluorimetrischen Detektion kombiniert, wobei ein LightCycler System der Firma Roche sowie ein DNA Master SYBR Green I Kit verwendet wurden.

Der interkalierende SYBR Green I Fluoreszenzfarbstoff bindet nach der Elongationsphase an die kleine Furche (*minor groove*) der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA, wodurch ein Fluoreszenzsignal generiert wurde. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge. (Abb. 2.5.)

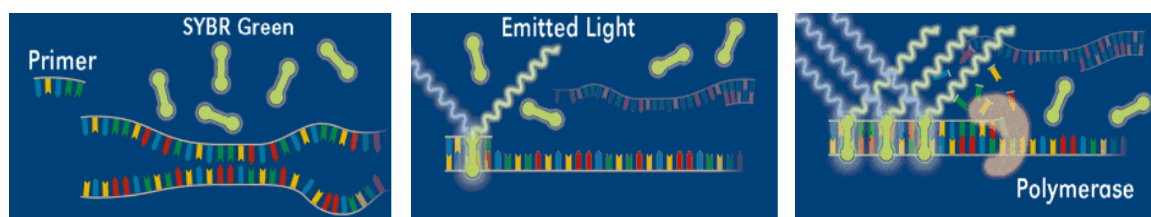


Abb. 2.5. Darstellung der prinzipiellen **SYBR Green I Methode**. (Links) Die Reaktionskomponenten liegen im Ansatz vor. (Mitte) Nach der Primeranbindung lagert sich SYBR Green I an die doppelsträngige DNA. (Rechts) Die Fluoreszenzintensität nimmt während der Elongationsphase proportional zur DNA-Konzentration zu.

Während der PCR erfolgt die Detektion der emittierten Fluoreszenz über eine optische Einheit, die drei Filter der entsprechenden Emissionsmaxima (530, 640, 710 nm) enthält. Das LightCycler Programm erstellt somit eine Quantifikations-Kurve der Fluoreszenzintensität (dF) in Abhängigkeit von der Zyklenanzahl, sowie eine Schmelzkurve der Fluoreszenz (dF) in Abhängigkeit von der Temperatur (dT). Eine quantitative Aussage kann durch den Vergleich mit einem Standard definierter Konzentration an DNA-Kopien getroffen werden.

2.6.2. Quantifizierung und Identifizierung des PCR-Produkts

Die Datenverarbeitung erfolgte mit der gerätespezifischen LightCycler Computersoftware (Version 3.5). Das Fluoreszenzsignal nimmt mit jedem Amplifikationsschritt zu und ist während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur Konzentration der DNA. Bei der Quantifizierung ist jedoch der Zeitpunkt von Bedeutung, an dem das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen hervortritt. Durch die im Programm enthaltene *Second Derivative Maximum Analysenmethode* wurde der *Crossing Point* individueller Proben automatisch festgelegt, wobei der erste Wendepunkt der Fluoreszenzkurve identifiziert wurde. Der Wendepunkt geht dabei aus dem ersten Maximum der zweiten Ableitung hervor. Auf der Basis charakteristischer Reaktionsparameter wurde die Konzentration enthaltener DNA-Mengen anhand einer externen Standardkurve berechnet, welche mit einer Verdünnungsreihe der Plasmid-DNA des Zielgens generiert wurde. Mindestens ein Standard (10^6 Kopien) der Plasmid-DNA wurde mit jeder Probenserie mitgeführt. Die Kopiezahl der Plasmidmoleküle der zu untersuchenden Probe ergab sich aus deren Molekulargewicht (Anzahl der Basenpaare x 635 g/mol).

2.6.3. Schmelzkurvenanalyse

Es erfolgte der Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes, welche sich auf den charakteristischen Schmelzpunkt bezog, den jede doppelsträngige DNA spezifisch aufweist. Der Schmelzpunkt wurde von der Produktlänge, und dem GC-Gehalt der Sequenz des zu untersuchenden Gens beeinflusst. Erstellt wurde die Schmelzkurve individueller Proben durch Erhitzen, was zur Denaturierung des synthetisierten DNA-Doppelstranges führt. Da der Farbstoff SYBR Green I ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet, sinkt die Fluoreszenzintensität linear. Beim Erreichen des spezifischen Schmelzpunktes kommt es zu einem Signalabbruch. Das DNA-Produkt wurde vollständig in Einzelstränge denaturiert und der Farbstoff wurde folglich freigesetzt.

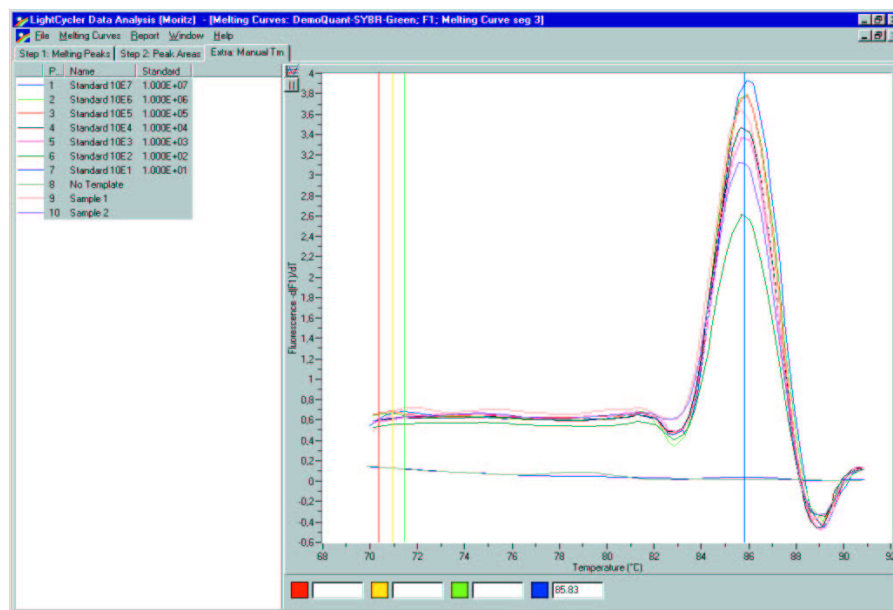


Abb. 2.6. **Schmelzkurvenanalyse** und Darstellung der Kurve als Funktion ($-dF/dT$) durch das LightCycler Programm.

Die Darstellung der Kurve (Abb. 2.6.) ergibt sich aus der negativen Ableitung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur ($-dF/dT$), wodurch der Signalabbruch bei der spezifischen Temperatur als Maximum dargestellt werden kann. Unspezifische Primer-Dimere konnten erkannt werden, da sie einen wesentlich geringeren Schmelzpunkt aufwiesen. Zusätzlich wurden die Produkte der quantitativen *Real Time* PCR mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.6.4. PCR Ansatz für die quantitative *Real Time* PCR

Es wurde das TH-Expressionsprofil bestimmt, wobei GAPDH als *housekeeping*-Gene diente. Vorbereitend wurden Standardkurven mit den Verdünnungen (10^8 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 Kopien) der entsprechenden Plasmid-DNA-Standards generiert.

Folgende Primersequenzen wurden für die PCR Reaktion eingesetzt:

Spezifischer Primer	Primersequenz 5' - 3'	T _A
GAPDH (FW) GAPDH (RV)	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	60 °C
TH (FW) TH (RV)	GTG CCA GAG AGG ACA AGG TC ATC TCT TCC GCT GTG TAT TCC	59°C

Tabelle 3 Spezifische Primersequenzen der Zielgene und deren Annealing Temperatur (T_A).

Die Primer wurden ebenfalls mit der *primer3*-Software erstellt. Sie sind intronüberspannend, um eine Amplifikation genomischer DNA ausschließen zu können.

Die Reaktionsansätze sowie alle Verdünnungen wurden unter einer Sterilbank in autoklaviertem bidestilliertem Wasser angesetzt, um Kontaminationen zu verhindern. Es wurden vergleichbare cDNA-Mengen (<10 ng/μl) verwendet und in dem folgenden Ansatz dem LightCycler System zugeführt.

Komponente	TH	GAPDH
Wasser	11,9 μl	12,9 μl
MgCl ₂ (25mM)	3 μl (= 4 mM)	2 μl (= 3 mM)
Primer (10pM)	2,5 μl	2,5 μl
TaqStart Antikörper	0,1 μl	0,1 μl
SYBR Green I (10x)	2,5 μl	2,5 μl
cDNA-Template	5 μl	5 μl
25 μl Endvolumen		

20 μl des Endvolumens wurden in eine Glaskapillare überführt, welche anschließend verschlossen und kurz abzentrifugiert wurde. Die Proben wurden nun in den Rotor des LightCycler Gerätes gestellt und das vorbereitete Programm der PCR-Reaktion wurde gestartet.

Es wurden drei Phasen durchlaufen, wobei die Tansitionsraten 20°C/s betragen und die Bedingungen wie folgt einzustellen waren.

1. Einleitende Denaturierung bei 95°C für 1 min
2. Amplifikation in 50 Zyklen
 - a. Denaturierung bei 95°C für 1 s
 - b. Annealing Temperatur für 4 s
 - c. Elongation bei 72°C für 17-18 s
3. Schmelzpunktanalyse
 - a. Schnelles Erhitzen der DNA bei 98°C für 0 s
 - b. Abkühlung auf 60°C für 10 s
 - c. Langsames Erhitzen auf 98°C mit einer Transitionsrate von 0,2°C/s
4. Abkühlung auf 40°C für 30 s

Die Glaskapillaren wurden vorsichtig entnommen, in 1,5 ml-Eppendorfgefäße bei maximal 2000 rpm abzentrifugiert und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.6.5. Herstellung des DNA-Standards für die *Real Time* PCR

Lösungsansätze:

TOPO TA Cloning Kit	SOC-Medium, TOP10 <i>chemically competent E. coli</i> cells
Nährmedien	s. 2.2.1.2. Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>
PCR-Produkte	mit TH-(212 bp) und GAPDH-(452 bp) Primern
Plasmid Mini Kit	enthält die notwendigen Säulen, Puffer sowie RNase A (100 mg/ml)

2.6.5.1. Klonierung des DNA-Fragments

Das Fragment einer PCR wurde mit dem TOPO TA *Cloning Kit* in den pCR®II-TOPO Plasmidvektor (4.0 kb), welcher 3'-überhängende Desoxythymidinreste besitzt, kloniert. Die Ligation ist möglich, da die Taq DNA-Polymerase an die 3'-Enden der PCR-Produkte Desoxyadenosinreste bindet. Wesentliche Bestandteile des Vektors sind der Sp6 Promotor, der pUC Replikationsursprung, das LacZ-Gen, die Ampicillin-Kanamycin-Resistenzgene sowie die multiple Klonierungsstelle. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Primer verwendete, um frische PCR-Produkte zu amplifizieren und zu klonieren.

2.6.5.2. Transformation von kompetenten *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die in den Vektor ligierten PCR-Fragmente, welche zirkulär vorliegen, wurden in kompetente *Escherichia coli* Bakterien (TOP10 One Shot[®] *E. coli*) transformiert. Transformierte Zellen wurden von nicht-transformierten Zellen durch eine eingebrachte Ampicillin-Resistenz sowie die zu codierende Sequenz für das Enzym β -Galaktosidase (LacZ-Gen) selektiert. Zu 50 μ l der *E. coli* Zellen wurden 3 μ l des Ligationsansatzes pipettiert, vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 30 s bei 42°C im Wasserbad. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis gelagert, mit 250 μ l SOC-Medium aufgefüllt und für weitere 60 min bei 37°C auf dem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l des Transformationsansatzes auf ampicillinhaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden vor Licht geschützt über Nacht im Brutraum (37°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden selektiv drei weiße Kolonien in 2 ml LB-Flüssigmedium überimpft, um die Bakterien für 6 Stunden zu expandieren. Eine Kontroll-PCR-Reaktion mit 1 μ l der Flüssigkultur und eine nachfolgende Agarosegelelektrophorese gaben Aufschluss darüber, ob das DNA-Fragment (*Insert*) erfolgreich transformiert werden konnte.

Folgender PCR-Ansatz wurde pipettiert:

1 μ l Kultursuspension
2,5 μ l Forward (FW) TH-Primer (5 μ M)
2,5 μ l Reverse (RV) M13-Primer (5 μ M)
1 μ l dNTP-Mix (10mM)
2,5 μ l 10 x Ex Taq Reaktionspuffer
1,8 μ l steriles bidestilliertes Wasser
<u>0,2 μl Ex Taq Polymerase</u>
11,5 μl Endvolumen

Die selektierten Klone wurden anschließend der Plasmid-Isolierung zugeführt (Minipräparation).

2.6.5.3. Isolierung der Plasmid-DNA durch Minipräparation

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte Schritt für Schritt nach der Miniprep-Methode der Firma Qiagen. Ein Teil der *E. coli* Kultur wurde zuvor als Glycerolstock eingefroren. Das Reinigungsprinzip beruht darauf, dass die Bakterien durch den NaOH/SDS-haltigen Puffer unter Zusatz von RNase lysiert werden. Während SDS zum Abbau der Zellwand und der Freisetzung des Zellinhalts führt, denaturiert NaOH die chromosomale DNA sowie vorhandene Proteine. Das erhaltene Lysat wurde mit einem Salzpuffer neutralisiert, wodurch es zur Präzipitation der denaturierten Bestandteile sowie der Zellbruchstücke kommt. Die wesentlich kleinere Plasmid-DNA liegt nach der Zentrifugation im Überstand vor, welcher vollständig auf eine Quarzmembran überführt wurde. Die Membran wurde gewaschen, trocken zentrifugiert und die absorbierte Plasmid-DNA konnte in einem weiteren Arbeitsschritt mit Puffer eluiert werden. Der DNA-Gehalt wurde, wie im Abschnitt 2.5.3. beschrieben, bestimmt.

2.6.5.4. Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Überprüfung der integrierten DNA-Fragmente und um eine Inhibierung der PCR durch die Struktur der *supercoiled* DNA zu vermeiden, wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym BamH1 geschnitten und linearisiert. Entsprechend den Herstellerangaben wurde folgender Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3,25 µl Plasmid-DNA (= 513,5ng)
1 µl BamH1
0,1 µl BSA
1 µl NE-Puffer
<u>4,65 µl DEPC-behandeltes Wasser</u>
10 µl Endvolumen

Das Enzym wurde bei 80°C für 20 min inaktiviert, und die so linearisierte Plasmid-DNA wurde zur Identifizierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.6.5.5. Sequenzierung der Plasmid-DNA mit integriertem cDNA-Fragment

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG. Dazu wurden 2 µg der zu sequenzierenden Plasmid-DNA-Proben eingetrocknet und verschickt.

2.7. Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Experimente wurden als Mittelwert und dessen mittlerer Fehler angegeben, wobei die aufgeführten Formeln die Grundlage der Berechnungen bilden.

Mittelwert $\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$

Standardabweichung (STABWA) $s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$

mittlerer Fehler des Mittelwertes ($SEM = \text{standard error of the mean}$) $S_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Es wurden Signifikanzanalysen anhand statistischer Auswertungen durchgeführt. Hierbei wurden sowohl das Statistikprogramm *StatView* als auch spezielle Literatur [Kesel B. *et al.*, 1999] herangezogen. Es erfolgte eine programmierte Bearbeitung der aufgeführten Prüfverfahren:

1. Es wurde eine Hypothese für das durchgeführte Experiment formuliert.
2. Es wurde unter Berücksichtigung der gegebenen Voraussetzungen ein adäquater Test gewählt. Stichprobenart (unverbunden, gebunden); Prüfung der Normalverteilung; Prüfung auf Gleichheit der Varianzen; Feststellung des Stichprobenumfangs; Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte.
3. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde festgestellt.
4. Es wurde die für den gewählten Test erforderliche Prüfgröße PG berechnet.
5. Die Signifikanzschranke SSchr (=p) wurde ermittelt.
6. Es erfolgt die Bewertung der Hypothese.

Mit Hilfe der umfangreichen Prüfverfahren, lässt sich der Vorteil der Statistiksoftware leicht erkennen. Es können in kürzester Zeit eine Vielzahl gewonnener Daten auf signifikante Unterschiede hin untersucht werden, wobei die Wahl des geeigneten Testverfahrens in jedem Fall von größter Wichtigkeit ist. Die Ermittlung der signifikanten Unterschiede wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer faktoriellen ANOVA und anschließender PSLD Fisher Analyse durchgeführt ($p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden neurale Progenitoren aus dem ventralen Mesenzephalon der embryonalen Ratte isoliert, um *in vitro* die Proliferation und Differenzierung spezifischer neuraler Zelltypen zu untersuchen und zu optimieren. Dabei bestand das vordergründige Ziel in der Induktion der Zelldifferenzierung zu dopaminergen Neuronen, welche bei der Parkinsonschen Krankheit selektiv degeneriert werden. Da ausdifferenzierte Dopaminneurone des adulten Gehirns aufgrund des fehlenden Proliferationspotentials nicht natürlich regeneriert werden können, stellt die Zellkulturtechnik eine viel versprechende Möglichkeit zur *in vitro* Generierung und somit zur Behandlung der neurodegenerativen Erkrankungen dar.

Derzeitig ist die Vielzahl der pathogenen Faktoren und deren Ineinandergreifen, welche zur Ausbildung des Morbus Parkinson führen, erst im Ansatz bekannt. Dabei wird jedoch unter anderem der Einfluss von oxidativem Stress in Zusammenhang mit verschiedenen biochemischen Veränderungen in der Substantia nigra gebracht. Damit stellt dieser einen wesentlichen Faktor in der Ursache der Degeneration dopaminergener Neurone dar [Fahn und Cohen, 1992; Jenner, 1998].

In den dargestellten Experimenten wurde der Einfluss des oxidativen Stresses auf neurale Zellkultursysteme untersucht. Dabei wurde getestet inwieweit das in der Nachwuchsforschergruppe entwickelte bioFolie-Membransystem als Stimulationsmodell für oxidativen Stress einsetzbar ist. Das Ziel bestand darin den Stress durch eine sauerstoffdurchlässige bioFolie-Membran zu erhöhen. Auf dieser wurden die Zellen kultiviert und diffundierender Sauerstoff übte direkten Einfluss auf die Zellen aus. Weiterführend sollte der Einfluss verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die Zellkulturen und speziell auf die Differenzierung beschrieben werden. Zur Charakterisierung wurden sowohl zellbiologische als auch molekularbiologische Analysen durchgeführt.

3.1. Das bioFolie-Membransystem

Die Eignung des entwickelten bioFolie-Membransystems für die Zellkultur und der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Zellen wurde zunächst in der Kultur einer humanen Astrozytoma - Oligodendroglioma Zelllinie (GOS-3) untersucht. Dabei wurde vordergründig der Stoffwechsel der Zellen charakterisiert.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 400.000 Zellen/cm² vergleichsweise auf poly-L-Ornithin-beschichteten herkömmlichen Multiwellplatten sowie dem bioFolie-Membransystem ausgesät. Um nachweisen zu können inwieweit die bioFolie selbst einen Einfluss auf die Zellcharakteristik hat, wurde zusätzlich eine bioFolie-Kontrolle (bioFolie-Membran in der Multiwellplatte) als Kultursystem untersucht.

Alle Kulturansätze wurden in DMEM mit 10% FCS inkubiert, wobei jeweils Sauerstoffkonzentrationen von 2%, 5% und 21% im Inkubator eingestellt wurden.

3.1.1. Charakterisierung der Stoffwechselleistung von GOS-3-Zellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

3.1.1.1. Zellwachstum

Die GOS-3-Zellen wurden nach 4tägiger bzw. 13tägiger Kultivierung enzymatisch von der Kulturoberfläche abgelöst und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Initiale Untersuchungen wurden auf Multiwellplatten bei variierenden Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt, um die optimalen Wachstumsbedingungen sowie Zellzahl-dichten für nachfolgende Untersuchungen bestimmen zu können.

Der zeitliche Verlauf des Wachstums der kultivierten GOS-3-Zelllinie wurde über eine Kultivierungsdauer von 13 Tagen aufgenommen. Der Abb. 3.1. ist zu entnehmen, dass die Zellkulturen in den ersten 4 Tagen eine anfängliche lag-Phase aufwiesen. Bis zum 13. Kultivierungstag stiegen die Zellzahlen an, wobei unterschiedliche Zellkonzentrationen erreicht wurden. Unter Einfluss von 21% O₂ konnte ein exponentielles Wachstum beobachtet werden. Hierbei wurde nach 13tägiger Kultivierung eine 35fache Zellvermehrung sowie die Konfluenz der Kultur erreicht. Bei der Untersuchung des Zellwachstums bei 2% O₂ und 5% O₂ wurde deutlich, dass mit der Verringerung der Sauerstoffkonzentration die Inhibierung des Zellwachstums zunahm. So wiesen diese Kultivierungsansätze lediglich eine 14fache bzw. 11fache Proliferation auf. Es wurde eine Endzelldichte von 7,05·10⁵ Zellen/Well bei 21% O₂ ermittelt, die jedoch bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen nicht über 2,81·10⁵ Zellen/Well lag.

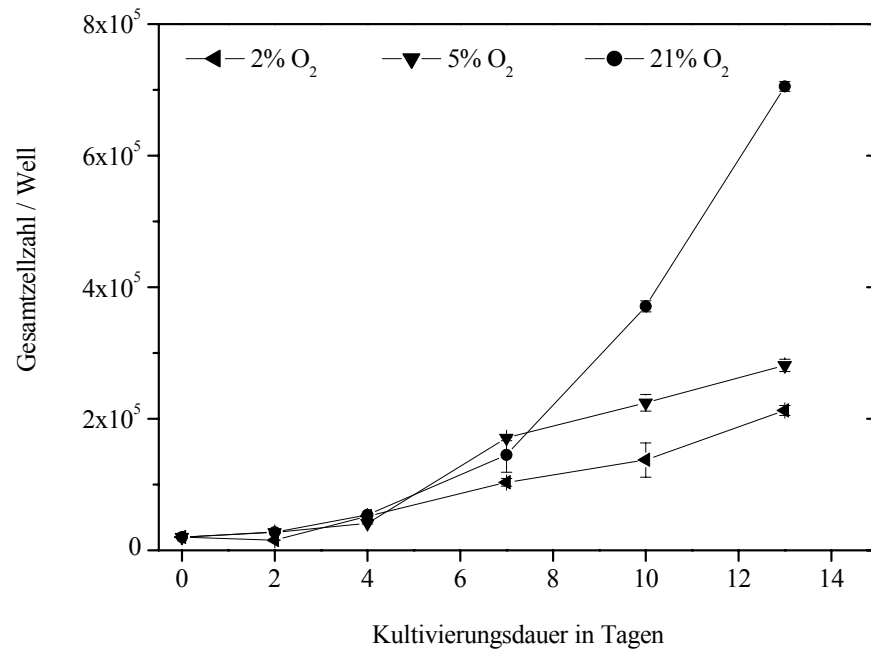


Abb. 3.1. **Wachstumskurven** der GOS-3-Zellen während einer Kultivierungsdauer von 13 Tagen in Multiwellplatten bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Ausgesät wurden 20.000 Zellen/Well. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Kultivierungen mit 3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM.

Durch die zusätzliche Kultivierung der Zellen auf unterschiedlichen Matrices (Plastik-Well, bioFolie-Kontrolle, bioFolie) konnten ähnliche Verhältnisse der Zellzahlen ermittelt werden. Vergleicht man die Kulturansätze auf den Multiwellplatten mit denen auf der bioFolie-Kontrolle in Abb. 3.2. miteinander, so wurde kein signifikanter Einfluss des bioFolie-Materials selbst gezeigt. Es konnte beobachtet werden, dass in Kulturen bei hoher Sauerstoffkonzentration die höchste Gesamtzellzahl erreicht werden konnte. So wurden in allen Kulturen im bioFolie-Membransystem sowie in allen Kulturen bei 21% O₂ maximale Gesamtzellzahlen von bis zu $6,04 \cdot 10^5$ Zellen/Well ermittelt. Die GOS-3-Zellkulturen unter geringer Sauerstoffverfügbarkeit (2% O₂ und 5% O₂ in Multiwellplatten und bioFolie-Kontrolle) wiesen hingegen lediglich Maximalwerte von $4,17 \cdot 10^5$ Zellen/Well auf.

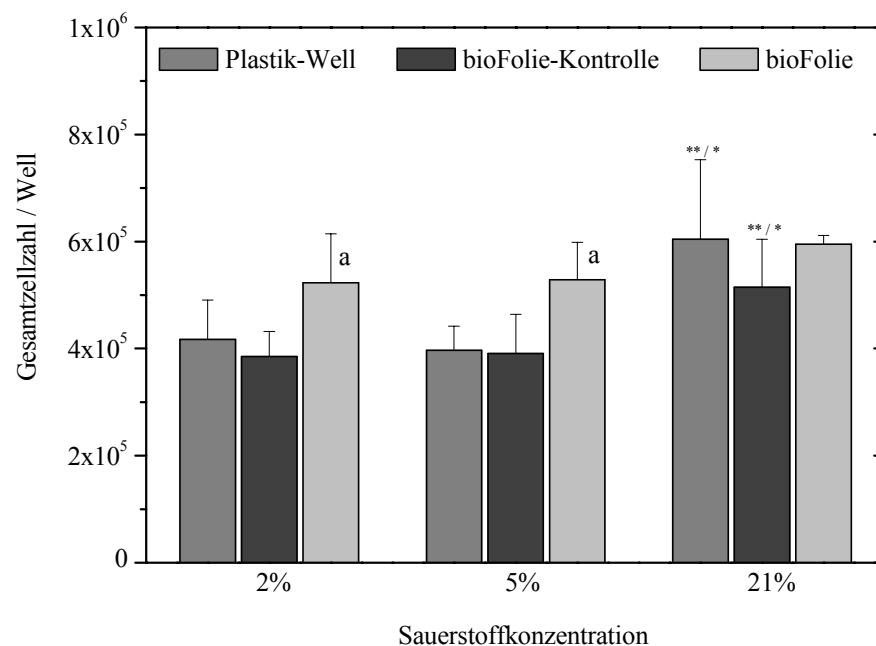


Abb. 3.2. **Zellzahlbestimmung** der GOS-3-Zellen nach 4tägiger Kultivierung in Multiwellplatten aus Plastik (Plastik-Well), im bioFolie-Membransystem (bioFolie) sowie der bioFolie-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O₂, 5% O₂ und 21% O₂. (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O₂ auf gleicher Matrix.

3.1.1.2. Glukose- und Laktatkonzentration

Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden nach 4tägiger Kultivierung in den Medienüberständen der GOS-3-Kulturen bestimmt. Als Nullwert dienten die Konzentrationsbestimmungen des frisch hergestellten Mediums. Die ermittelten Werte der zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate sowie der zellspezifischen Laktatbildungsrate wurden zusammenfassend in Abb. 3.3. graphisch dargestellt. Die Kulturen wurden auch hier unter variierenden Sauerstoffkonzentrationen (2%, 5%, 21%) und poly-L-Ornithin-beschichteten Matrices (Plastik-Well, bioFolie-Kontrolle, bioFolie) inkubiert.

Betrachtet man die Kulturen in Multiwellplatten (Plastik-Well) und bioFolie-Kontrolle so konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dabei wurden maximale Laktatbildungsrate von $1015,88 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen und maximale Glukoseverbrauchsrate von $597,75 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (bei 2% O_2 auf bioFolie-Kontrolle) ermittelt. Mit steigender Sauerstoffverfügbarkeit zeigten die Kulturen sowohl eine deutliche Abnahme in ihrem zellspezifischen Glukoseverbrauch als auch in der zellspezifischen Laktatbildung, wodurch Raten von $157,31 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen bzw. $125,76 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen dargestellt werden konnten.

Hingegen wiesen die Kulturen bei 2% O_2 und 5% O_2 im bioFolie-Membransystem sehr viel geringere Glukoseverbrauchsrate und folglich geringere Laktatbildungsrate auf. Eine signifikante Abnahme dieser Raten im Vergleich zu Multiwellplatten spiegelte sich in den minimalen Glukoseverbrauchsrate von $133,93 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen sowie minimalen Laktatbildungsrate von $167,57 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen bei 5% O_2 wieder. Bezieht man sich ausschließlich auf die ermittelten Werte in den Kulturen bei 21% O_2 , so sind annähernd gleiche Glukose- und Laktatkonzentrationen ermittelt worden. Diese Glukoseverbrauchsrate lagen zwischen $111,75 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (bei 21% O_2 im bioFolie-Membransystem) und $169,81 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (bei 21% O_2 auf der bioFolie-Kontrolle). Vergleichend konnten in denselben Kulturen Laktatbildungsrate zwischen $121,34 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen und $183,62 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen erreicht werden.

In sauerstoffreichen Kulturen konnte ein Verhältnis von etwa einem Mol Laktat zu einem Mol Glukose im Medium beobachtet werden, während sich dieses unter sauerstoffärmeren Kulturbedingungen (in Multiwellplatten und bioFolie-Kontrolle bei 2% O_2 und 5% O_2) veränderte. Hier wurde ein Verhältnis von einem Mol Glukose zu zwei Mol Laktat nachgewiesen.

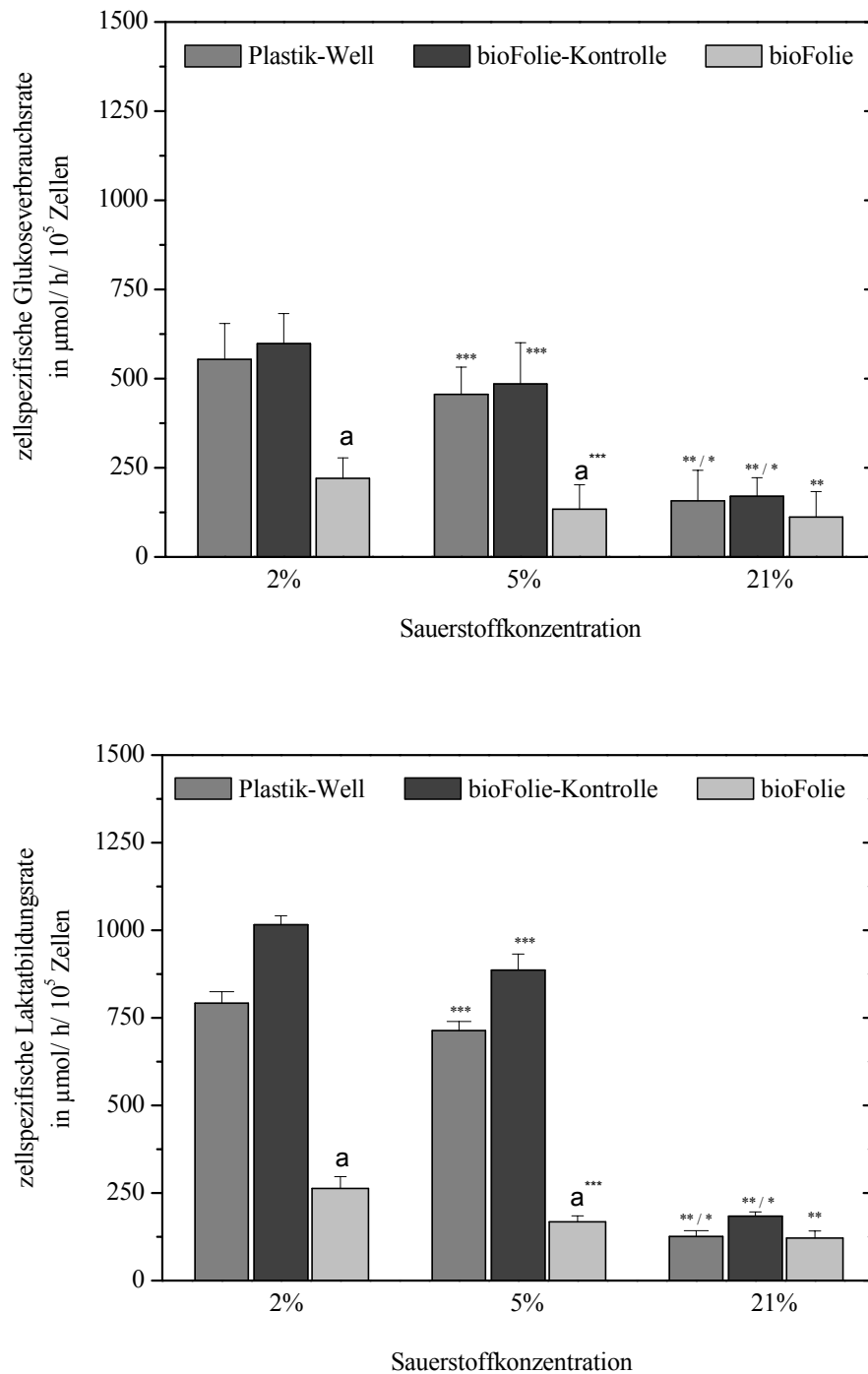
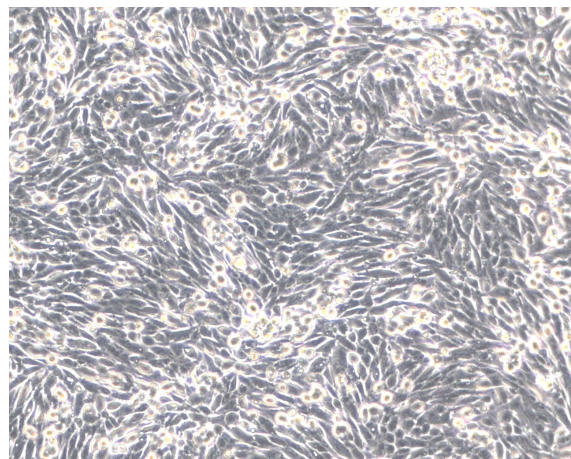


Abb. 3.3. **Zellspezifische Glukoseverbrauchsrate** (oberer Graph) und **Laktatbildungsrate** (unterer Graph) der GOS-3-Zellen nach einer 4tägigen Kultivierungsdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O₂, 5% O₂ und 21% O₂. (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O₂ auf gleicher Matrix.

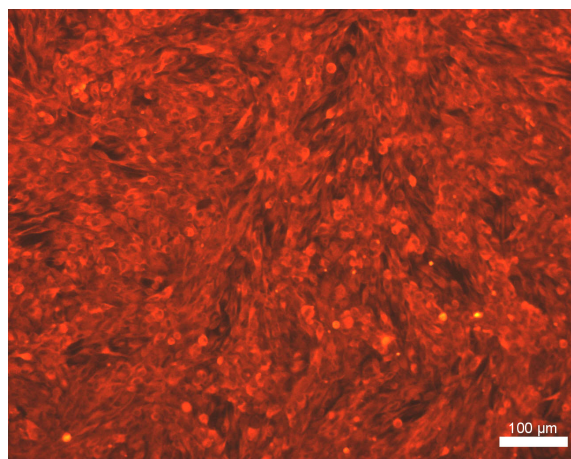
3.1.1.3. Immunzytochemische Analyse der GFAP-Expression

Aufgrund dessen, dass die gliale GOS-3-Zelllinie das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) exprimiert, wurde dieses durch immunzytochemische Markierungen nachgewiesen. Dazu wurden die Zellkulturen nach 4tägiger Kultivierung fixiert und mit einem primären Antikörper gegen GFAP inkubiert. Es sollten vergleichend die Zellkulturen in Multiwellplatten, im bioFolie-Membransystem sowie auf der bioFolie-Kontrolle bei 2%, 5% und 21% O₂ charakterisiert werden.

Da mit Hilfe der Immunzytochemie keine Unterschiede in den Kulturen bezüglich der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen und Matrices beobachtet werden konnten, wurde die immunzytochemische Markierung exemplarisch in Abb. 3.4.B dargestellt. Außerdem wird die lichtmikroskopische Aufnahme (Abb. 3.4.A) der GOS-3-Zellen gezeigt. Es wurde in allen Zellkulturen GFAP nachgewiesen.



A



B

Abb. 3.4. (A) **Lichtmikroskopische Aufnahme** der GOS-3-Zellkultur. (B) **Immunzytochemische Markierung** gegen das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) in GOS-3-Kulturen auf poly-L-Ornithin-beschichteten Zellkulturoberflächen.

3.1.2. Charakterisierung der Stoffwechselleistung von PC-12-Zellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Als weiteres Zellsystem wurde die Pheochromacytoma Zelllinie der Ratte (PC-12) verwendet, um spezifische Untersuchungen des Sauerstoffeinflusses auf die Dopamin-expression durchführen zu können. Die Katecholamin-produzierende Zelllinie stammt aus einem Nebennierentumor und weist das Enzym Tyrosin-Hydroxylase auf, welches der Ausgangspunkt der Katecholaminsynthese ist. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Phenylalanin zu Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa), aus dem wiederum durch Decarboxylierung das Dihydroxyphenylamin (Dopamin) entsteht. Aus diesem Grund wurde dieses Zellsystem als Modell dopaminerge Zellen verwendet.

Die Kulturen wurden für die Untersuchungen mit einer Zelldichte von 600.000 Zellen/cm² sowohl auf Multiwellplatten als auch auf petriPERM Zellkulturschalen (bioFolie-Membran) ausgesät. Beide Zellkulturgefäße wurden vorbereitend mit Kollagen I beschichtet, und die Kulturansätze wurden unter gleichen Kulturbedingungen (bei 2%, 5% und 21% O₂) in RPMI-1640 Medium mit 1% FCS und 2% Pferdeserum inkubiert.

3.1.2.1. Zellzahlbestimmung

Im Anschluss an das mechanische Ablösen der Zellen nach einer 4tägigen Kultivierung wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die in Abb. 3.5. dargestellten Gesamtzellzahlen wiesen zwischen den einzelnen Kulturansätzen keine signifikanten Unterschiede auf. Es konnte eine durchschnittliche Gesamtzelldichte von $2,3 \cdot 10^6$ Zellen berechnet werden, wobei maximale Zellzahlen von $2,86 \cdot 10^6$ Zellen (bei 5% O₂ im bioFolie-Membransystem) ermittelt wurden. Während die Zellzahlen aller Kulturansätze bei 5% O₂ und 21% O₂ weitgehend stabil blieben, war zu beobachten, dass die Zellen bei 2% O₂ eine schlechtere Adhärenz aufwiesen. Diese Beobachtungen konnten auch durch die geringfügige Verringerung der Gesamtzellzahl (durchschnittliche Zellzahlen von $1,69 \cdot 10^6$ Zellen in Multiwellplatten und $1,83 \cdot 10^6$ Zellen auf der bioFolie) bestätigt werden.

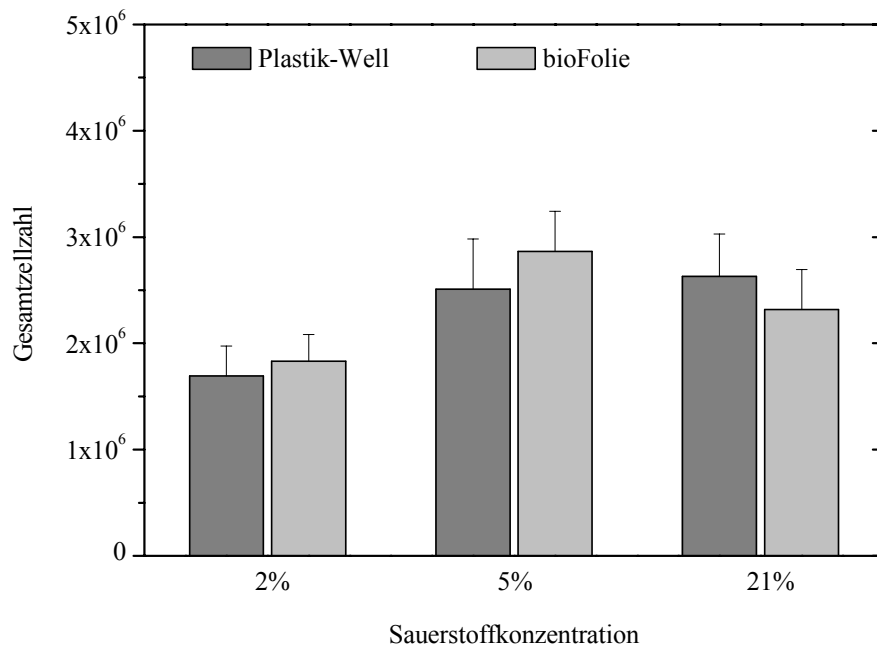


Abb. 3.5. **Zellzahlbestimmung** der PC-12-Zellen nach 4tägiger Kultivierung in Multiwellplatten aus Plastik (Plastik-Well) sowie im bioFolie-Membransystem (bioFolie). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Kultivierungen mit 2-3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O₂, 5% O₂ und 21% O₂. (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O₂ auf gleicher Matrix.

3.1.2.2. Glukose- und Laktatkonzentration

Als Stoffwechselparameter wurden nach 4tägiger Kultivierung sowohl die Glukosekonzentrationen als auch die Laktatakkumulationen im Medium bestimmt, welche in Abb. 3.6. als Verbrauchs- und Bildungsraten dargestellt sind. Die Raten beziehen sich auf die jeweilige Lebendzellzahl.

Die graphische Darstellung zeigt, dass die Sauerstoffkonzentrationen einen signifikanten Einfluss auf das Stoffwechselverhalten der PC-12-Zellen haben. Ähnlich wie in den Kultivierungsversuchen unter Verwendung der GOS-3-Zelllinie zeigten alle Kulturen bei geringen Sauerstoffkonzentrationen (2% O₂ und 5% O₂) hohe Laktatbildungsraten.

In den Kulturen in Multiwellplatten stieg die Laktatbildungsrate aufgrund der unvollständigen Oxidation von Glukose bis zu maximalen Werten von 19,68 µmol/h/10⁵ Zellen (bei 2% O₂) an. In denselben Kulturansätzen konnte eine Glukoseverbrauchsrate von 10,91 µmol/h/10⁵ Zellen nachgewiesen werden. Mit steigender Verfügbarkeit von Sauerstoff sank die Laktatbildungsrate bis auf einen Wert von 3,72 µmol/h/10⁵ Zellen (21% O₂) ab. Gleichzeitig konnte auch eine geringere Glukoseverbrauchsrate von 3,17 µmol/h/10⁵ Zellen festgestellt werden.

In den Kulturen im bioFolie-Membransystem konnte ein ähnliches Verhalten beobachtet werden. In diesem System wurden hohe Sauerstoffkonzentrationen erreicht, da Sauerstoff durch die gaspermeable Membran diffundierte und somit das Zellsystem direkt beeinflussen konnte. Mit steigender Sauerstoffverfügbarkeit sanken sowohl die Glukoseverbrauchsraten als auch Laktatbildungsraten signifikant ab, was ebenfalls in dem GOS-3-Zellsystem der Fall war. Es wurden Minimalwerte beider Raten von 2,76 µmol/h/10⁵ Zellen (Glukoseverbrauch) sowie 3,41 µmol/h/10⁵ Zellen (Laktatbildung) bei 21% O₂ ermittelt. In diesen Versuchsansätzen (bei 21% O₂) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen in Multiwellplatten und denen im bioFolie-Membransystem gezeigt werden, wobei auch der Glukosegehalt von der Laktatbildung nicht abwich. Somit konnte ein Umsatz von einem Mol Glukose zu zwei Mol Laktat im Medium nicht nachgewiesen werden. Dieser Umsatz war hingegen bei Kulturen unter Einfluss geringer Sauerstoffkonzentrationen (2% O₂ in Multiwellplatten und bioFolie-Membransystem, sowie 5% O₂ in Multiwellplatten) tendenziell zu erkennen.

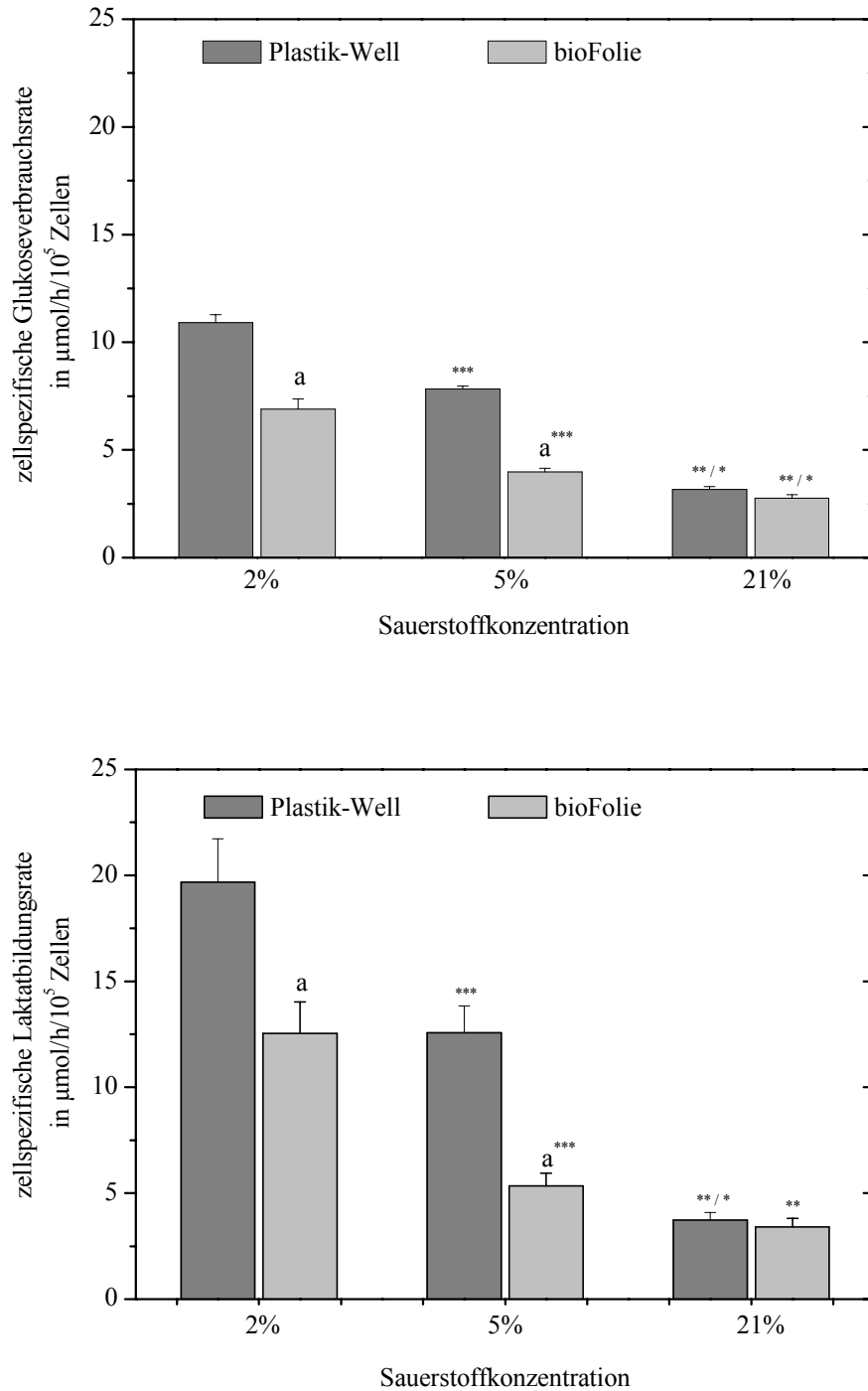


Abb. 3.6. **Zellspezifische Glukoseverbrauchsrate** (oberer Graph) und **Laktatbildungsrate** (unterer Graph) der PC-12-Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 4 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O_2 , 5% O_2 und 21% O_2 . (*) 5%/21% O_2 auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O_2 auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O_2 auf gleicher Matrix.

3.1.2.3. Expressionsanalyse des Markergens Tyrosin-Hydroxylase

Ziel der Untersuchungen war es die Genexpression der an der Dopaminsynthese beteiligten Tyrosin-Hydroxylase zu beschreiben, wobei diese durch unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen sowie verwendeten Matrices (Multiwellplatten, bioFolie-Membransystem) beeinflusst wurde. Inwieweit dies der Fall war, wurde zunächst mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Die Produkte der Reaktionen wurden auf ein Agarose Gel aufgetragen (Abb. 3.7.). Die Banden der GAPDH-Fragmente (*housekeeping-Gen*) wiesen wie erwartet eine Größe von 452 bp und die der TH-Fragmente eine Größe von 414 bp auf. Dabei zeigten die Banden 1-6 der TH-Expressionsanalyse mit steigender Sauerstoffkonzentration nur eine sehr geringfügige Abnahme der Bandenintensität. Eine Abnahme der TH-Expression war hauptsächlich an den Banden 5 und 6 (Kultivierung bei 21% O₂) zu erkennen. Die Kontrollen (RNA), welche in den Banden 7 dargestellt sind, waren jeweils negativ. Dies schließt eine Verunreinigung durch genomische DNA aus.

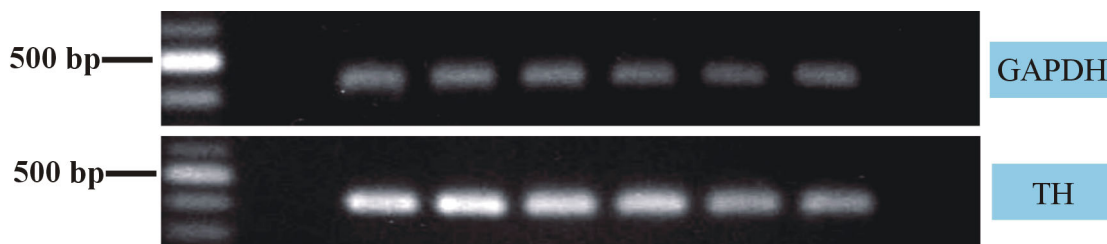


Abb. 3.7. **Expressionsanalyse** des Markergens Tyrosin-Hydroxylase mittels RT-PCR in PC-12-Kulturen nach einer 4tägigen *in vitro* Kultivierung. Dargestellte werden die Banden folgender Kultivierungsbedingungen (1) bei 2% O₂ im bioFolie-Membransystem (BMS) (2) bei 2% O₂ in Multiwellplatten (MWP) (3) bei 5% O₂ im BMS (4) bei 5% O₂ in MWP (5) bei 21% O₂ im BMS (6) bei 21% O₂ in MWP (7) Negativkontrolle (RNA). Die Bandengrößen wurden mit Hilfe eines Größenmarkers XIV bestimmt.

Um quantitative Aussagen über das Regulationsprofil der Tyrosin-Hydroxylase treffen zu können, wurde weiterführend eine *Real Time* PCR durchgeführt. Diese stellt derzeit das sensitivste Analysenverfahren dar, womit geringe mRNA Konzentrationen quantitativ und qualitativ bestimmt werden können. Vorbereitend erfolgte die Isolation der RNA mittels Trizol-Aufreinigung nach einer 4tägigen Kultivierung sowie einer anschließenden cDNA-Synthese. Außerdem war es notwendig einen Plasmid-DNA-Standard herzustellen, sowie Standardkurven mit den Verdünnungen (10⁸, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² Kopien) der entsprechenden Plasmid-DNA-Standards (für TH bzw. GAPDH) zu generieren (s. 2.6.5).

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte unter Verwendung der gerätespezifischen LightCycler Computersoftware (Version 3.5), wobei jeweils ein entsprechender externer Plasmid-DNA Standard (10^6 Kopien) zur Berechnung diente. Auch hier wurde das *housekeeping*-Gen Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Alle PCR-Produkte wurden auf ihre Spezifität anhand einer Schmelzkurvenanalyse überprüft, wie sie in Abb. 3.8. exemplarisch dargestellt ist. Zusätzlich wurden die Bandengrößen in einem Agarose Gel mittels eines Größenstandards XIV kontrolliert. Der Graph in Abb. 3.8. stellt die negative Ableitung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur ($-dF/dT$) dar. So ergab sich ein anfänglicher Anstieg der Fluoreszenzintensität, welche bei einer spezifischen Temperatur (Schmelzpunkt) von $87,9^{\circ}\text{C}$ für das TH-Fragment stark zunahm. An diesem Punkt wurde das PCR-Produkt vollständig aufgeschmolzen, wodurch es zu einem Signalabbruch kam, der hier als Maximum dargestellt wurde. Unspezifische Primer-Dimere konnten aufgrund des wesentlich geringeren Schmelzpunkts identifiziert werden. Die sich ergebenden TH-Expressionen aus zwei unabhängigen Kulturansätzen wurden in Abb. 3.9. zusammenfassend dargestellt. Anhand des Säulendiagramms ist zu erkennen, dass sich eine tendenzielle Abnahme der exprimierten TH-Konzentration von etwa 10 pg auf 5,5 pg pro ng Gesamt-RNA abzeichnet. Es ist dennoch zu erwähnen, dass sich aufgrund der hohen Standardabweichungen (SEM) keine signifikanten Unterschiede berechnen ließen. Im Vergleich lassen sich die Beobachtungen der semi-quantitativen RT-PCR bestätigen, da eine Abnahme der TH-Expression mit steigender Sauerstoffkonzentration (21% O_2 in Multiwellplatten und im bioFolie-Membransystem) nachgewiesen werden konnte. Wenn auch die vergleichenden Ergebnisse zwischen den beiden Matrices keine eindeutige Regulation bewiesen, so ist doch eine leichte Abnahme der Genexpression in allen Kulturen im bioFolie-Membransystem zu erkennen.

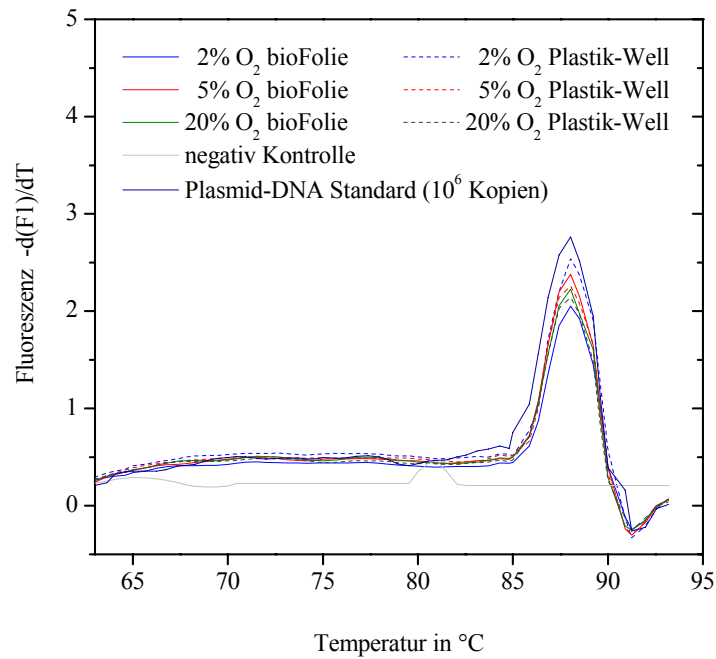


Abb. 3.8. **Schmelzkurvenanalyse** einer LightCycler PCR zur TH-Expressionsanalyse. Darstellung der Fluoreszenzstärke in Abhängigkeit von der Temperatur als Funktion ($-dF/dT$).

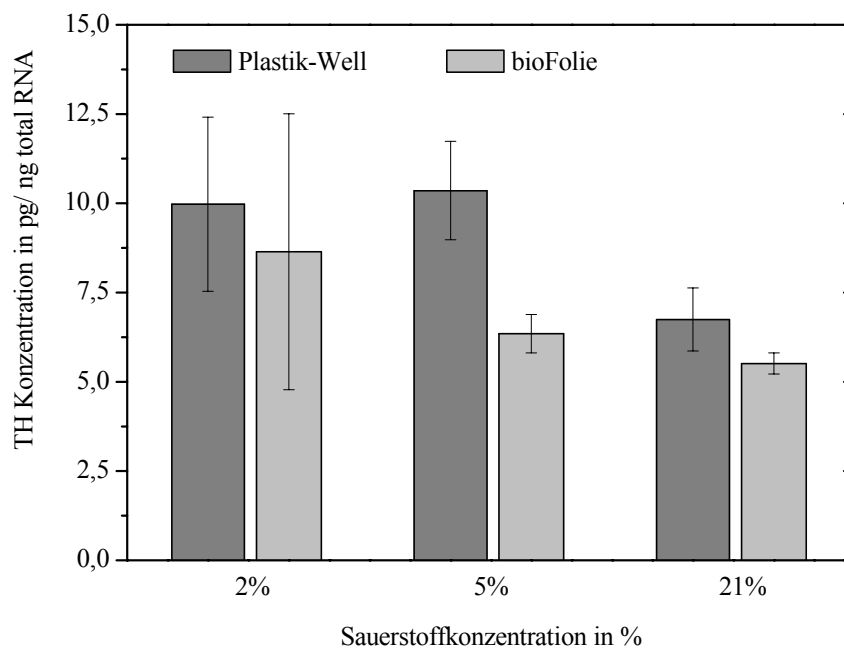


Abb. 3.9. **Quantitative Real Time PCR** zur Bestimmung der TH-Expression nach einer 4tägigen Kultivierung. Dargestellt werden die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Kultivierungen mit 3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O_2 , 5% O_2 und 21% O_2 . (*) 5%/21% O_2 auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O_2 auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O_2 auf gleicher Matrix.

3.1.2.4. Dopaminkonzentration im Medienüberstand

Zusätzlich zu den ermittelten Stoffwechselparametern wurde der Gehalt an Dopamin im Medienüberstand bestimmt, wobei die High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Technologie in Kombination mit einer elektrochemischen Detektion herangezogen wurde. Es sollte untersucht werden, ob das Verhalten in der Genexpression in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen auch auf der Proteinebene zu beobachten war.

Zur quantitativen Bestimmung des Dopamingehalts wurde nach 4tägiger Kultivierung bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (2%, 5%, 21%) und Matrices (Plastik-Well, bioFolie-Kontrolle, bioFolie) 1 ml Medienüberstand zügig entnommen und mit Stabilisierungslösung versetzt, um eine Oxidation des Dopamins zu verhindern. Vorbereitend erfolgte eine Extraktion der Katecholamine, welche selektiv an Aluminiumoxid adsorbiert wurden (s. 2.3.3.1.).

In Abb. 3.10. wurde die Dopaminkonzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration sowie der Matrix dargestellt, wobei deutlich wurde, dass die Abnahme der Dopaminkonzentration umso stärker erfolgte, je mehr Sauerstoff zur Verfügung stand. Dieses Phänomen kann zum einen auf die Unterregulation des TH-Gens zurückgeführt werden, zum anderen aber auch durch die Autoxidation von Dopamin in Anwesenheit von erhöhten Sauerstoffkonzentrationen verursacht werden.

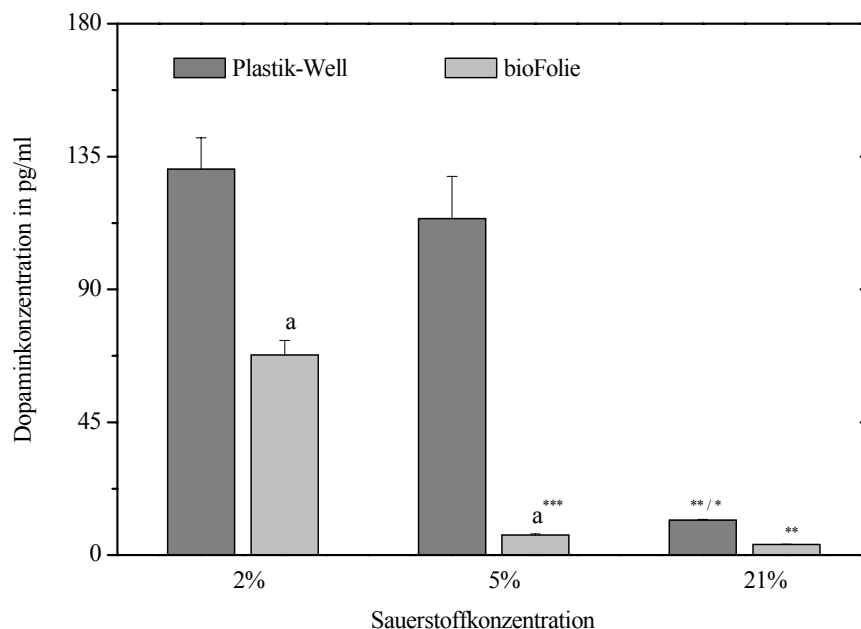


Abb. 3.10. **Dopaminkonzentration** im Medienüberstand nach einer 4tägigen Kultivierung der PC-12-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O₂, 5% O₂ und 21% O₂. (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O₂ auf gleicher Matrix.

3.1.2.5. Immunzytochemische Analyse der TH-Expression

Parallel zu den Untersuchungen der Genexpression und der Bestimmung der Dopamin-konzentrationen im Medienüberstand wurden die unter gleichen Bedingungen (in Multiwellplatten und im bioFolie-Membransystem bei 2%, 5% und 21% O₂) kultivierten PC-12-Zellen nach 4tägiger Kultivierung durch Zugabe von Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen immunzytochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen Tyrosin-Hydroxylase (Maus anti-TH) markiert.

Bei einer 20fachen Vergrößerung, wie sie in Abb. 3.11. zu sehen ist, konnte man deutlich nachweisen, dass alle Zellen positiv auf die immunzytochemische Färbung gegen die Tyrosin-Hydroxylase reagierten. Bei genauer Betrachtung sind der nicht angefärbte Bereich des Zellkerns sowie der teilweise stark angefärbte zytosolische Bereich zu erkennen. Generell konnten bei allen Kulturen unabhängig von der Sauerstoffkonzentration und der Matrizes keine eindeutigen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität oder der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Folglich war es nicht möglich direkte Aussagen über eine Über- oder Unterregulation der Tyrosin-Hydroxylase zu treffen. Lediglich die Ergebnisse der Gesamtzellzahl konnten anhand der deutlich geringeren Zelldichten in den Kulturansätzen bei 2% O₂ bestätigt werden.

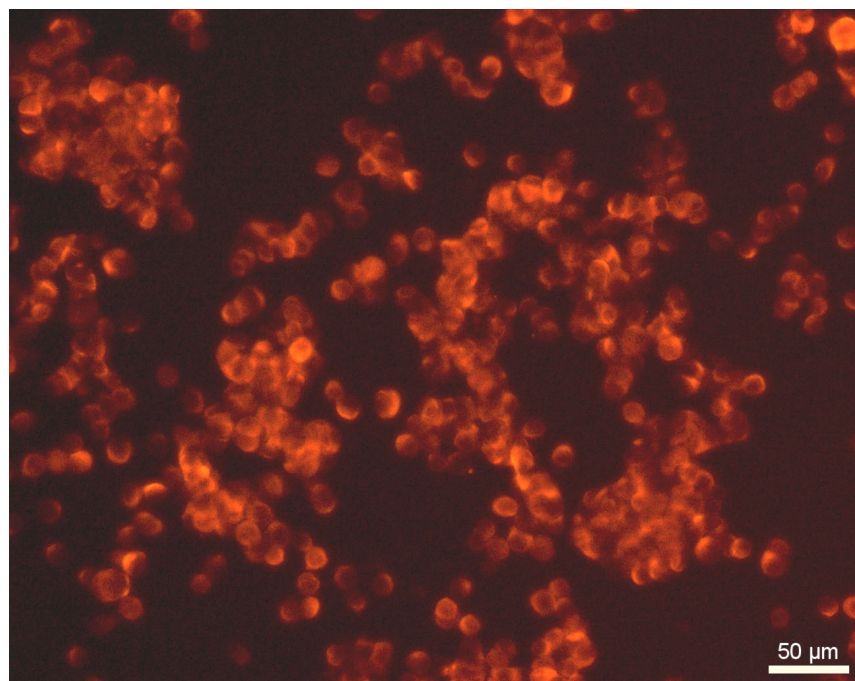


Abb. 3.11. **Immunzytochemische Markierung** gegen Tyrosin-Hydroxylase in PC-12-Kulturen auf Kollagen I-beschichteten Multiwellplatten bei 2% O₂ (links) und 21% O₂ (rechts).

3.1.2.6. Untersuchungen zur Apoptose in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Zur weiteren Charakterisierung der PC-12-Zellkulturansätze wurde der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Induktion des apoptotischen Zelltodes analysiert. Zur Durchführung der Untersuchungen wurde der *in situ cell death Detection* Kit der Firma Roche verwendet. Das Prinzip der Methode besteht in der spezifischen TUNEL (*TdT-dependent dUTP nick end labeling*)-Technik, wodurch DNA-Strangbrüche, die während der Apoptose durch aktivierte Endonukleasen entstehen, fluoreszenzmarkiert wurden. Die markierten apoptotischen Zellen konnten durch eine anschließende immunzytochemische Färbung lichtmikroskopisch dargestellt und somit visuell ausgewertet werden (s. 2.4.5.). Zur quantitativen Analyse der apoptotischen Zellen, wie sie exemplarisch in Abb. 3.12. dargestellt wurden, wurden jeweils fünf zufällig ausgewählte Bereiche eines Kulturgefäßes mit Hilfe eines Zählgitters ausgezählt. Die Gesamtzellzahl der jeweiligen Bereiche ergab sich aus der Quantifizierung der DAPI-positiven Zellen (Kernfärbung). Die Kulturen wurden in drei unabhängigen Versuchen unter gleichen Bedingungen in Multiwellplatten sowie im bioFolie-Membransystem bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (2%, 5%, 21%) inkubiert.

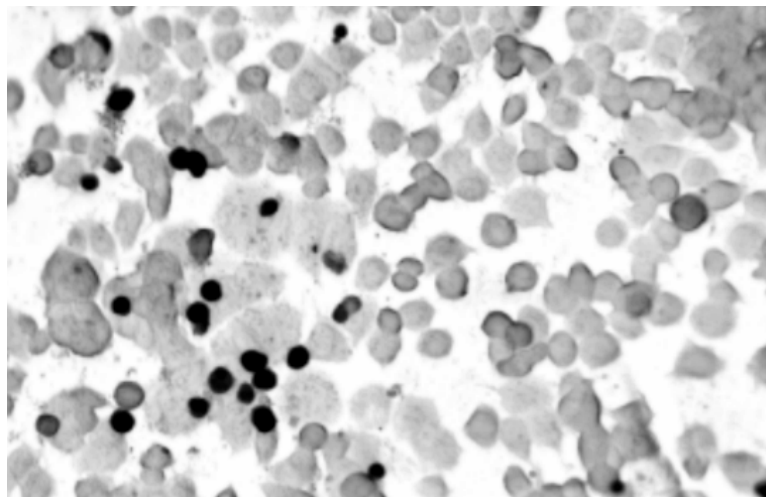


Abb. 3.12. Vergrößerung einer **TUNEL-Markierung** apoptotischer PC-12-Zellen. Zu erkennen sind nicht-markierte Zellen sowie positiv-markierte Zellen, deren Zellkern eine tief-schwarze Färbung aufweist.

Die mikroskopischen Aufnahmen der TUNEL-markierten PC-12-Zellen sind in Abb. 3.13. exemplarisch dargestellt. Apoptotische Zellen wiesen eine tief-schwarze Färbung auf, welche durch den Umsatz des DAB-Substrats durch die an den Antikörper gebundene Peroxidase entstand. Zur Beurteilung der Zellkulturen wurden die quantitativen Auswertungen herangezogen, welche zusammenfassend in Abb. 3.14. als Mittelwerte dargestellt sind.

In der graphischen Darstellung wurde deutlich, dass ein maximaler Anteil an apoptotischen Zellen von 5,64% in den Zellkulturen bei 2% O₂ in Multiwellplatten nachgewiesen werden konnte. Dieser Anteil sank kontinuierlich mit der Zunahme des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs bis auf 0,47% (bei 21% O₂) ab.

Betrachtete man hingegen die Kulturen im bioFolie-Membransystem, so konnten keine signifikanten Unterschiede bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nachgewiesen werden. Es wurde ein maximaler Anteil an apoptotischen Zellen von 1,8% (bei 2% O₂) bestimmt, welcher in Kulturen höherer Sauerstoffkonzentrationen bei 1,16% (bei 5% O₂) bzw. 1,18% (bei 21% O₂) lag. Vergleicht man nun die Kulturen bei 21% O₂ auf beiden Matrices miteinander, so ist eine Induktion der Apoptose um einen Faktor von 2,5 in den Kulturansätzen im bioFolie-Membransystem zu erkennen.

Während ein erhöhter Zelltod in den Kulturen bei 2% O₂ in Multiwellplatten auf sehr schlechte Kulturbedingungen für die PC-12-Zellen zurückgeführt werden konnte, ist der signifikante Anstieg der Apoptose bei höchster Sauerstoffverfügbarkeit (21% O₂ im bioFolie-Membransystem) von Bedeutung. Eine Induktion der Apoptose könnte hierbei mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses begründet werden.

Oxidativer Stress steht bei den Untersuchungen zur Ursache der selektiven Degeneration dopaminergischer Neurone mit im Vordergrund. Dieser entsteht durch eine vermehrte Bildung freier Radikale im Zellsystem, was auf den Dopamin-Katabolismus sowie die Dopamin-Autooxidation zurückgeführt werden kann. Aufgrund des diffundierenden Sauerstoffs durch die gaspermeable Membran wurde die Sauerstoffverfügbarkeit in der Kultur erhöht. Es ist nahe liegend, dass somit auch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies erhöht wurde, welche einen schädlichen Effekt auf das Zellsystem ausübten.

Zusammenfassend ließ sich anhand der Ergebnisse schlussfolgern, dass neben den schlechten Kulturbedingungen (geringe Sauerstoffverfügbarkeit) auch die Erhöhung der oxidativen Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies zu einer Induktion der Apoptose führen konnte. Das bioFolie-Membransystem konnte aufgrund dessen für weiterführende Untersuchungen zum Einfluss des oxidativen Stresses verwendet werden.

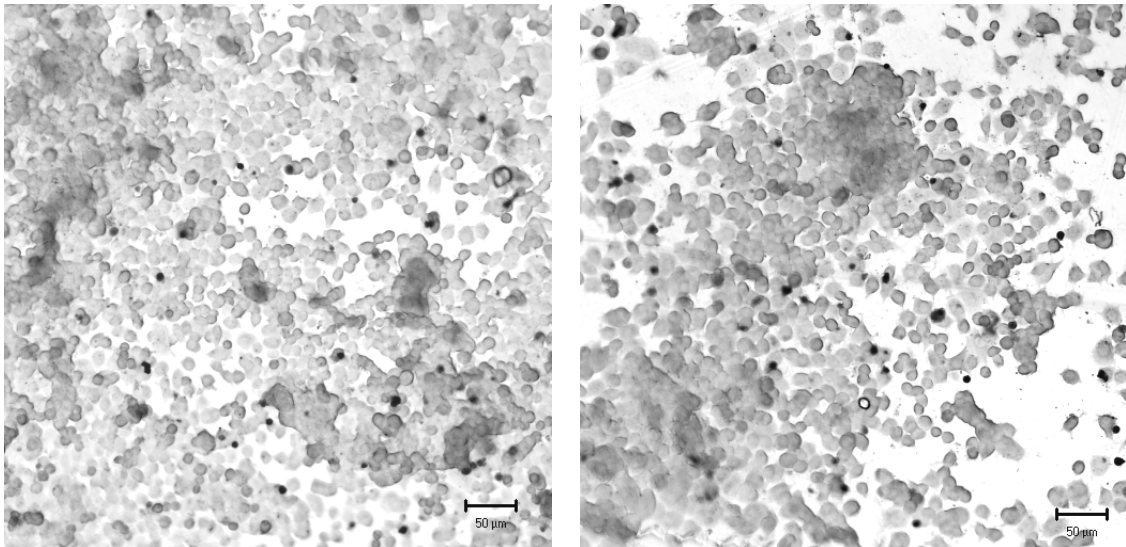


Abb. 3.13. **TUNEL-Markierung** apoptotischer PC-12-Zellen (tief-schwarz angefärbt) nach 4tägiger Kultivierung bei 21% O₂ in Multiwellplatten (links) sowie bei 21% O₂ im bioFolie-Membransystem (rechts).

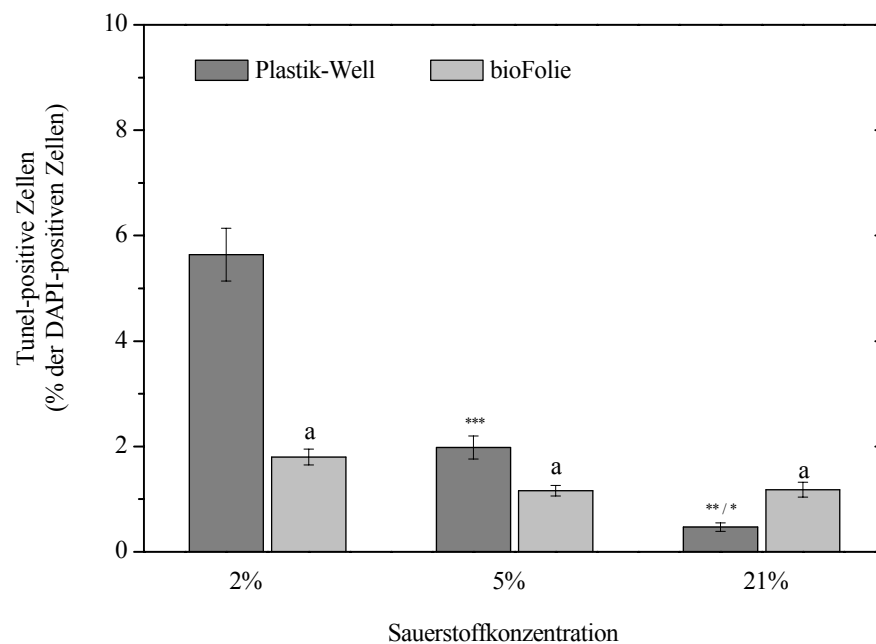


Abb. 3.14. **Quantitative Auswertung der TUNEL-Markierungen** apoptotischer PC-12-Zellen nach 4tägiger Kultivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Kultivierungen mit 2-3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Je Kulturansatz wurden 5 zufällig ausgewählte Bereiche quantitativ bestimmt. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 2% O₂, 5% O₂ und 21% O₂. (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (**) 2%/21% O₂ auf gleicher Matrix. (***) 2%/5% O₂ auf gleicher Matrix.

3.2. Charakterisierung neuraler Progenitoren des ventralen Mesenzephalons der embryonalen Ratte

Da im Vordergrund der Arbeit die detaillierte Untersuchung neuraler Progenitoren und deren Induktion zur Differenzierung zu dopaminergen Neuronen stand, werden in dem folgenden Abschnitt die Ergebnisse der Proliferations- und Differenzierungsuntersuchungen beschrieben. Aufgrund der dargestellten Experimente wird deutlich, dass die Ausbeute an dopaminergen Neuronen durch verschiedenste Faktoren der *in vitro* Kultivierung beeinflusst werden kann.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Verfahren der Zwei-Schritt-Kultivierung verwendet. Hierbei wurden die Zellen aus dem ventralen Mesenzephalon der Ratte isoliert und im ersten Schritt unter Zusatz des Wachstumsfaktors bFGF vermehrt. Im Anschluss an die 6tägige Proliferation wurden die Zellen mechanisch von der Zellkulturoberfläche gelöst, suspendiert und erneut ausgesät. Somit konnte die Differenzierung der neuralen Zellen zu dopaminergen Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet und charakterisiert werden.

3.2.1. Isolation und Proliferation neuraler Progenitoren

Ein wesentlicher Kritikpunkt im Einsatz embryonaler Zellen, als Zellersatz bei Morbus Parkinson, ist die benötigte Menge an Zellmaterial. Aus diesem Grund ist es von Interesse die limitierte Zellzahl, welche aus einem isolierten ventralen Mesenzephalon gewonnen werden kann, durch die *in vitro* Expansion zu erhöhen.

Dabei wurden Progenitoren aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien gewonnen, um zu zeigen inwieweit die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen dadurch beeinflusst werden konnte.

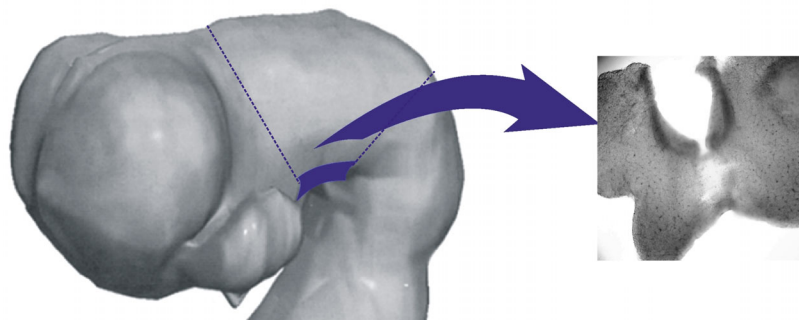


Abb. 3.15. Schematische Darstellung der **Isolation des ventralen Mesenzephalons** (blau markiert; die gestrichelte Linie markiert den Bereich des isolierten Mesenzephalons) aus dem embryonalen Rattenhirn. Dieses wurde schließlich durch einen sagittalen Schnitt des dorsalen Mesenzephalons isoliert. [modifizierte Darstellung nach Dr. L. Just]

In der vorliegenden Arbeit wurden die Progenitoren des ventralen Mesenzephalons aus Embryonen der Ratte isoliert, deren Entwicklungsstadium anhand der Größe (Kopf-Rumpf-Länge) bestimmt wurde (Abb.3.16). Dabei ergaben sich im Vergleich mit der Literatur [Godlewski *et al.*, 1997] Entwicklungsstadien von E11-12 (5-7 mm Kopf-Rumpf-Länge) bzw. E12-13 (8-9 mm Kopf-Rumpf-Länge).

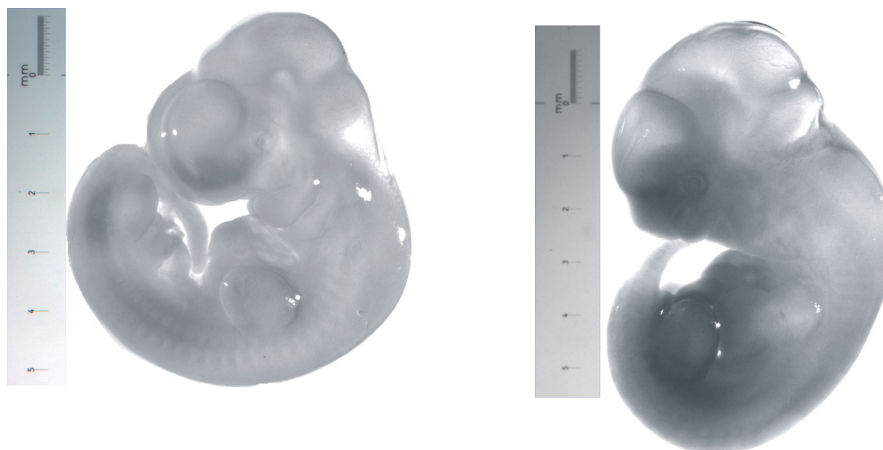


Abb. 3.16. **Embryonen der Ratte** sowohl am 11.-12. Tag der Embryonalentwicklung (E11-12) (links) als auch am 12.-13. Tag (E12-13) (rechts). Das Embryonalstadium wurde anhand der Kopf-Rumpf-Länge bestimmt. Anhand des Millimetermaßstabs kann eine Größe von 5-7 mm (E11-12) und 8-9 mm (E12-13) nachgewiesen werden.

Durch die Isolationen der ventralen Mesenzephalien und deren anschließende Dissoziation konnten Zellzahlen pro Mesenzephalon von 21.000 Progenitoren (E11-12) bzw. 63.000 Progenitoren (E12-13) gewonnen werden. Beobachtete man die Proliferationsraten dieser Kulturen nach einer 5tägigen Expansion, so konnten vergleichende Zellwachstumsfaktoren von 10,4 (E11-12) und 7,0 (E12-13) ermittelt werden. Dadurch konnten nach einer Aussaat von 20.000 Zellen/cm² Zellzahlkonzentrationen von durchschnittlich $2 \cdot 10^6$ Zellen (E11-12) bzw. $1,4 \cdot 10^6$ Zellen (E12-13) erwartet werden. Des Weiteren ergaben die Bestimmungen der Glukoseverbrauchsrate sowie der Laktatbildungsrate, dass diese in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen nicht signifikant unterschiedlich waren. Die ermittelten Raten nach 6tägiger Proliferation wurden in Abb. 3.17. zusammenfassend dargestellt. Dabei konnte ein maximaler Glukoseverbrauch von $17,8 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen ermittelt werden, welcher zu einer Laktatbildung von $28,5 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen führte (E12-13).

	E11-12 (5-7 mm Embryonen)	E12-13 (8-9 mm Embryonen)
Zellausbeute pro Mesenzephal	21272,6	63375,7
SEM	2656,5	5983,4
Zellwachstumsfaktor	10,39	7,04
SEM	1,49	0,47

Tabelle 4 **Vergleichende Darstellung der isolierten Progenitoren** aus dem ventralen Mesenzephalon der Rattenembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E11-12 und E12-13). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6-14 unabhängigen Präparationen und der jeweiligen SEM.

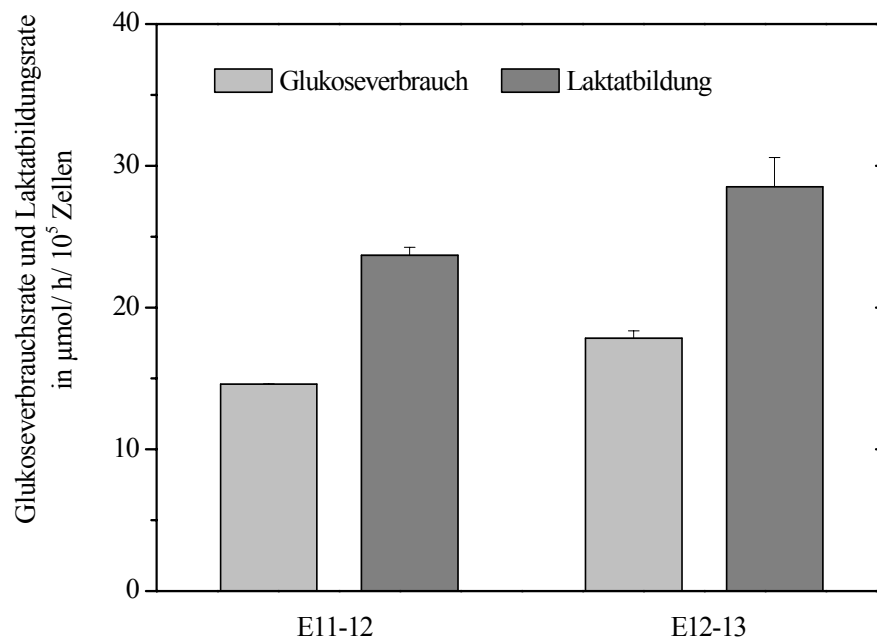


Abb. 3.17. Durchschnittliche **Glukoseverbrauchsrate** und **Laktatbildungsrate** nach einer 6tägigen Proliferationsdauer neuraler Progenitoren in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen (E11-12 bzw. E12-13) aus denen die Zellen gewonnen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Kultivierungen mit 2 Wiederholungen und der jeweiligen SEM.

Während der Proliferation spielt neben dem Zusatz von Wachstumsfaktoren auch die Adhäsion der Zellen an die vorhandene Matrix eine wichtige Rolle. Dabei wurden innerhalb der Arbeitsgruppe initiale Untersuchungen durchgeführt, um die Proliferationsbedingungen bezüglich einer geeigneten Matrix zu optimieren und eine maximale Zellvermehrung zu erzielen. Die aus dem ventralen Mesenzephalon der embryonalen Ratte (E12) isolierten neuralen Progenitoren wurden in Multiwellplatten ausgesät, welche zuvor mit einer Matrix aus Laminin-Fibronectin (L/FN) oder einer Kombination aus Laminin-Fibronectin-poly-L-Ornithin (L-FN-PO) beschichtet wurden.

Außerdem wurde das Kultivierungsmedium (DMEM/F12/N2/B27) der Kulturen auf L/FN für die ersten 24 Stunden nach der Isolation und Aussaat mit 1% FCS versetzt. Das Serum wurde am nächsten Tag durch einen Medienwechsel entzogen. In allen Ansätzen wurde der Wachstumsfaktor bFGF, welcher bereits in vorliegenden Studien untersucht worden ist [Bouvier *et al.*, 1992], eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter 5% CO₂ und 5% O₂ bei 37°C.

Um die mitotisch aktiven Zellen bestimmen zu können, wurden die Ansätze nach einer 6tägigen Proliferationsdauer mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdU) für 30 min inkubiert. Wie die Abb. 3.18. zeigt, wurden die markierten Zellen, welche das BrdU inkorporiert hatten, anschließend immunzytochemisch detektiert und quantifiziert.

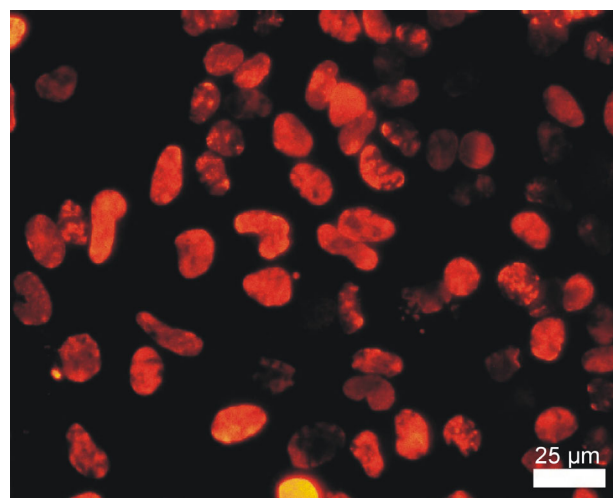


Abb. 3.18. Bestimmung der **Proliferationskapazität** mittels BrdU-Markierung in der Kultur neuraler Progenitoren des ventralen Mesenzephalons embryonaler Ratten. Markiert wurden die Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Markierung in der Phase der Zellteilung (Mitose) befanden.

Das in Abb. 3.19. dargestellte Diagramm zeigt die Proliferationskapazität neuraler Progenitoren, welche aus embryonalen Mesenzephalien unterschiedlicher Entwicklungsstadien isoliert wurden. Anhand der immunzytochemischen Analysen konnte die quantitative Aussage getroffen werden, dass sich bei Verwendung einer Laminin-Fibronectin-Matrix (+ 1% FCS in den ersten 24 h nach der Isolation) bis zu 34,47% der Gesamtzellzahl neuraler Zellen (E12-13) nach 6tägiger Kultivierung noch in der Proliferationsphase befanden. Im Vergleich dazu sank die Kapazität auf 27,63% in Kulturen auf einer Laminin-Fibronectin-poly-L-Ornithin-Beschichtung.

Signifikante Unterschiede der Proliferationskapazität in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen konnten nicht beobachtet werden.

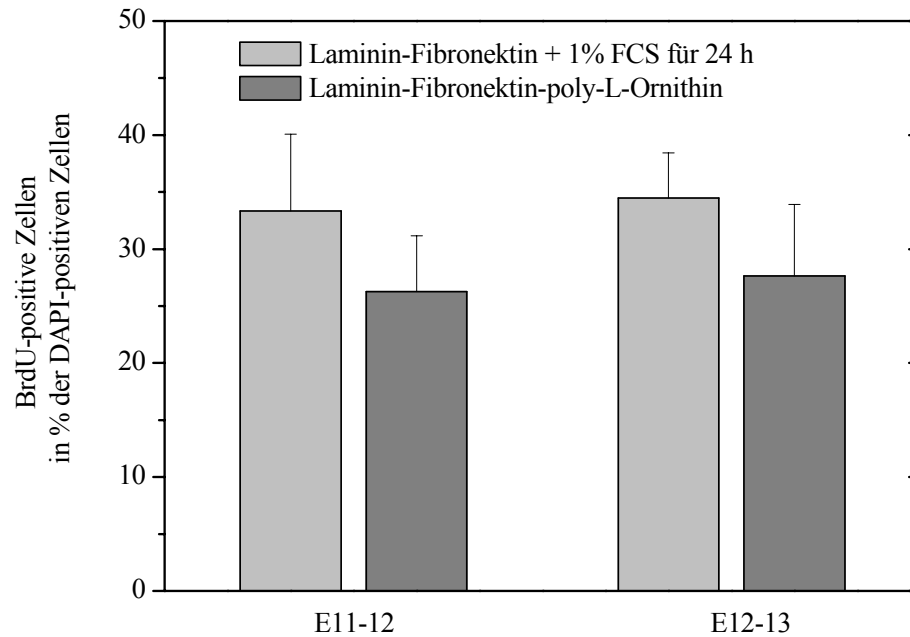


Abb. 3.19. Bestimmung der **Proliferationskapazität** mittels BrdU-Markierung in der Kultur neuraler Progenitoren des ventralen Mesenzephalons embryonaler Ratten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen (E11-12 bzw. E12-13). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Kultivierungen mit 2 Wiederholungen und der jeweiligen SEM.

3.2.2. Differenzierung neuraler Progenitoren

Im zweiten Schritt des Kultivierungsverfahrens werden die proliferierten Zellen mechanisch von der Zellkulturoberfläche gelöst und vorsichtig dissoziiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Zur weiteren Differenzierung der Progenitoren erfolgte die Aussaat in einer Zelldichte von 15.000 Zellen/Well (tropfenförmig) in Multiwellplatten. Nach einer 7tägigen Kultivierung in serumhaltigem Medium wurden neben Genexpressionsanalysen, Bestimmungen der Dopaminkonzentrationen sowie der Laktat- und Glukosekonzentrationen, auch immunzytochemische Analysen durchgeführt.

Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Inwieweit wird die Ausbeute an dopaminergen Neuronen durch das Entwicklungsstadium der Embryonen beeinflusst?
- Wie verändert sich die Differenzierung während der Kultivierungsdauer?
- Inwieweit wird die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen durch eine erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst?

3.2.2.1. Immunzytochemische Analysen

Parallel zu den genannten Analyseverfahren wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden spezifische molekulare Marker für verschiedene neuronale Zellsubtypen eingesetzt, welche eine Identifizierung einzelner Zellen im Zellkulturgemisch zuließen.

Der Nachweis der Neurone erfolgte durch Verwendung des spezifischen Markers β -Tubulin Typ III (TuJ1) (Abb. 3.20. rechts). Somit wurden die β -Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli, die dicksten Zytoskelettelemente des Neurons, fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Dopaminerge Neurone konnten mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH), dem Schlüsselenzym der Dopaminsynthese, detektiert werden (Abb. 3.20. links). Des Weiteren konnte das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2 (Abb. 3.21. links) markiert werden. Ein spezifischer Antikörper gegen das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) (Abb. 3.21. rechts), ein Intermediärfilament, soll zur Markierung der Astrozyten dienen. Diese stellen die am häufigsten auftretende Gruppe der Gliazellen dar.

Die quantitativen Auswertungen aller Kulturansätze bezogen sich vorrangig auf die Detektion der Tyrosin-Hydroxylase sowie der Neurone durch anti- β -Tubulin Typ III, wobei die Auszählungen wie in Abschnitt 2.4.5. beschrieben, erfolgten.

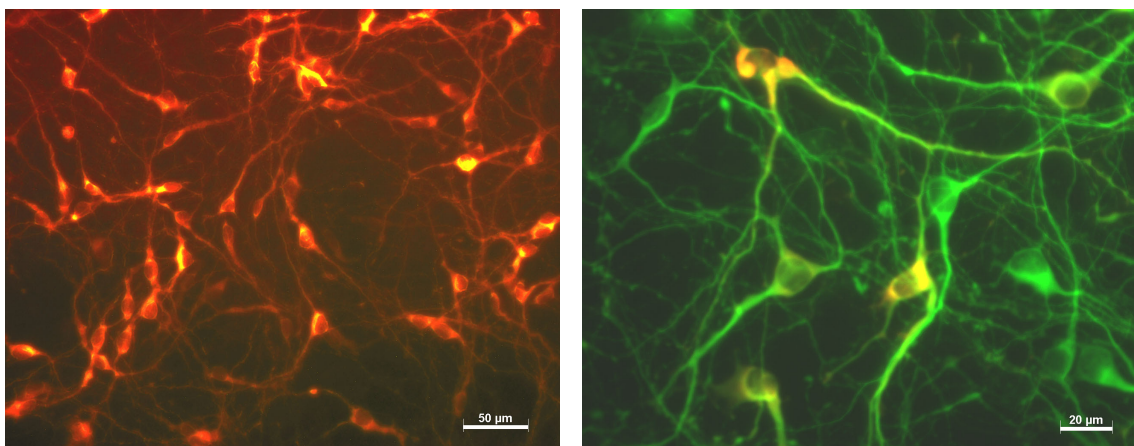


Abb. 3.20. **Immunzytochemische Markierung** (links) gegen das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) zur Detektion dopaminergener Zellen. Außerdem erfolgte eine Doppelmarkierung (rechts) gegen die β -Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli (TuJ1) sowie gegen TH zur Detektion dopaminergener Neurone. Neurone wurden durch eine sekundäre Alexa 488-Markierung (grün) und die dopaminergen Zellen durch eine sekundäre CY3-Markierung (rot) detektiert.

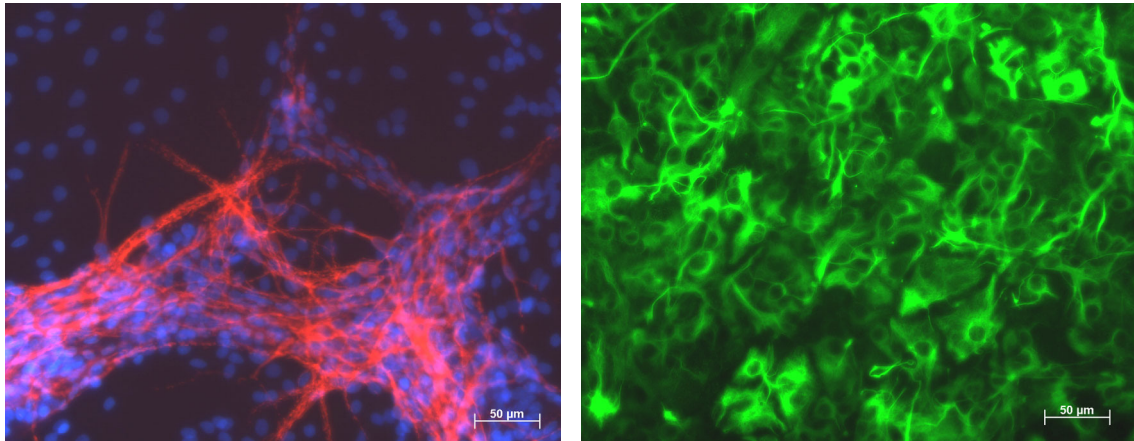


Abb. 3.21. **Immunzytochemische Markierung** (links) gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP2) zur Detektion von Neuronen (sekundäre CY3-Markierung, rot) sowie (rechts) das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) zur Detektion von fibrillären Astrozyten (sekundäre Alexa 488-Markierung, grün). Dargestellt ist eine zusätzliche Kernfärbung mit 4'-6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) (links; blau).

Charakterisierung in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen

Die Zellkulturen neuraler Progenitoren unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E11-12 und E12-13) wurden nach 7tägiger Differenzierung mit spezifischen Antikörpern charakterisiert. Dazu diente ein spezifischer Antikörper gegen Tyrosin-Hydroxylase, um dopaminerge Neurone zu identifizieren. Außerdem wurde ein Antikörper gegen β -Tubulin Typ III verwendet, um den Anteil der Neurone darstellen zu können. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt.

Anhand der Auszählung einzelner TH-positiver Zellkörper sowie der DAPI-positiven Kerne konnte ein Vergleich der dopaminergen Neuronenzahl in Abb. 3.22. graphisch dargestellt werden. Dabei ergab sich eine signifikant höhere Ausbeute an dopaminergen Neuronen von 37% der Gesamtzellzahl in den Zellkulturen, welche aus kleineren Embryonen (E11-12) gewonnen wurden. Dies entsprach einer absoluten Zellzahl an dopaminergen Neuronen von durchschnittlich 288 Zellen. Im Vergleich dazu lagen die Ausbeuten um einen Faktor >7 unter denen der Kulturen, deren Progenitoren aus größeren Embryonen (E12-13) stammten. Hier wiesen lediglich 5% der Gesamtzellzahl das Markerenzym Tyrosin-Hydroxylase auf.

Anhand der Ergebnisse konnte die Schlussfolgerung angestellt werden, dass neurale Progenitoren kleinerer Embryonen ein höheres Differenzierungspotential zu dopaminergen Neuronen aufweisen.

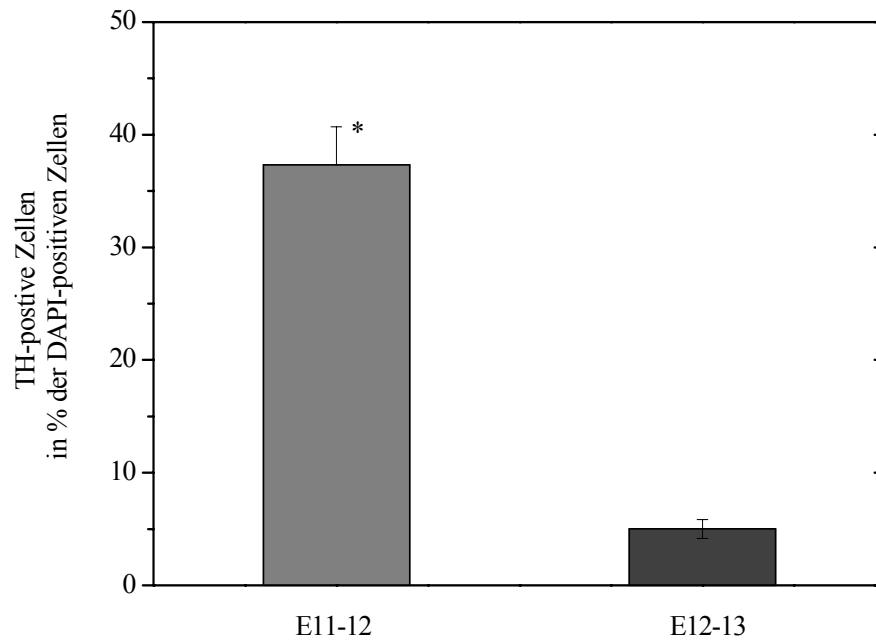


Abb. 3.22. **Vergleich der immunzytochemischen Markierungen** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH). Die neuronalen Progenitoren unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E11-12 und E12-13) wurden für 7 Tage bei 5% O₂ differenziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (*) E11-12/E12-13.

Die dargestellten Ergebnisse wurden in Abb. 3.23. veranschaulicht, welche die immunzytochemischen Markierungen gegen Tyrosin-Hydroxylase darstellen. Dabei wurde beobachtet, dass eine höhere Zellausbeute an TH-positiven (dopaminergen) Zellen erzielt werden konnte, wenn kleinere Embryonen (E11-12) verwendet wurden. Hingegen konnten nur wenige TH-positive Zellen aus größeren Embryonen (E12-13) nachgewiesen werden.

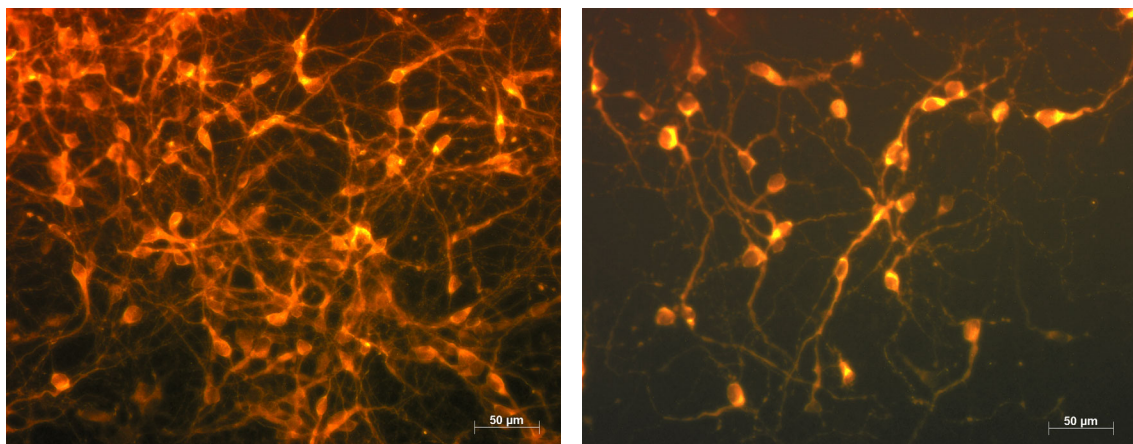


Abb. 3.23. **Immunzytochemische Markierung** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) nach einer 7tägigen Differenzierung neuraler Progenitoren aus dem ventralen Mesenzephalon von Embryonen des Entwicklungsstadiums E11-12 (links) und E12-13 (rechts).

Charakterisierung des Entwicklungsprofils während der Differenzierung

Neurale Progenitoren, welche aus kleineren Embryonen (E11-12) isoliert wurden, wurden unter denselben Bedingungen differenziert. Dabei wurden die Kulturen nach jedem Tag fixiert und immunzytochemisch gegen Tyrosin-Hydroxylase und β -Tubulin Typ III markiert. Die Quantifizierung der TH-positiven Neurone wurde zusammenfassend in Abb. 3.24. dargestellt. Daraus ergab sich ein kontinuierlicher Anstieg an Dopaminneuronen bis zum 6. Tag der Kultivierung, wobei absolute Zellzahlen TH-positiver Neurone von durchschnittlich 455 Zellen erreicht wurden. Nach einem weiteren Tag der Kultivierung konnte jedoch eine Abnahme der TH-positiven Zellen ermittelt werden, wobei durchschnittlich 331 Zellen gezählt wurden. Im Vergleich mit der in Abb. 3.22. ermittelten Ausbeute, welche einer Anzahl von 288 TH-positiven Zellen (E11-12) entsprach, ergaben sich annähernd gleiche Zellzahlen dopaminerger Neurone.

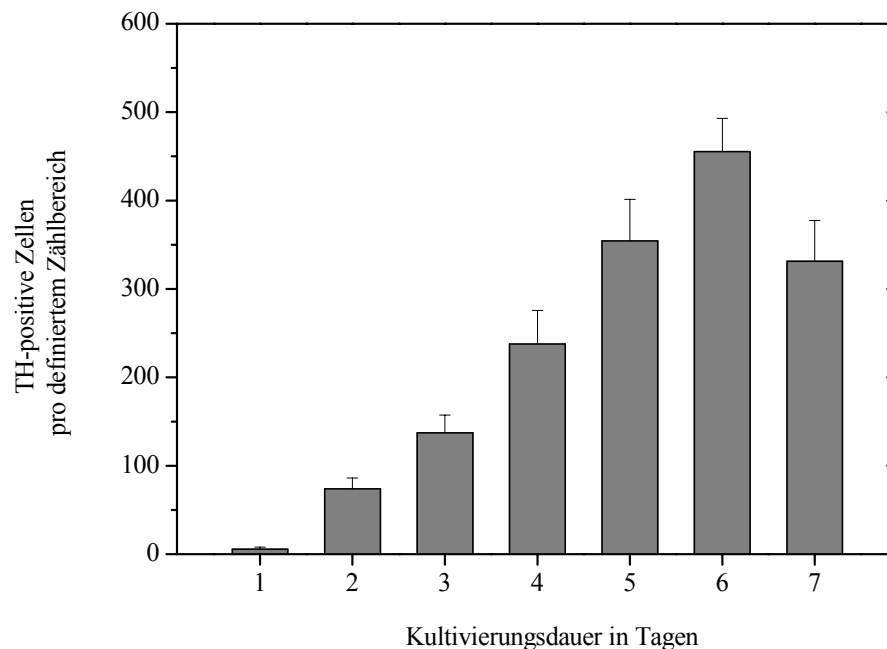


Abb. 3.24. **Quantifizierung der immunzytochemischen Markierungen** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (7 Tage). Die neuralen Progenitoren (E11-12) wurden 5 Tage proliferiert, anschließend passagiert und für weitere 7 Tage differenziert (bei 5% O₂). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM.

Gleiche Ergebnisse bezüglich der TH-Expression konnten auch in den Abbildungen 3.25. A-C durch die mikroskopischen Aufnahmen verdeutlicht werden. Außerdem konnte auch in den Abbildungen 3.25. D-F, welche die immunzytochemischen Markierungen gegen β -Tubulin zeigen, ein signifikanter Anstieg der Neurone in den ersten 6 Tagen verzeichnet werden. Ein leichter Rückgang der Intensitäten der Markierung nach 7 Tagen wurde auch hier beobachtet (Abb. 3.25. F).

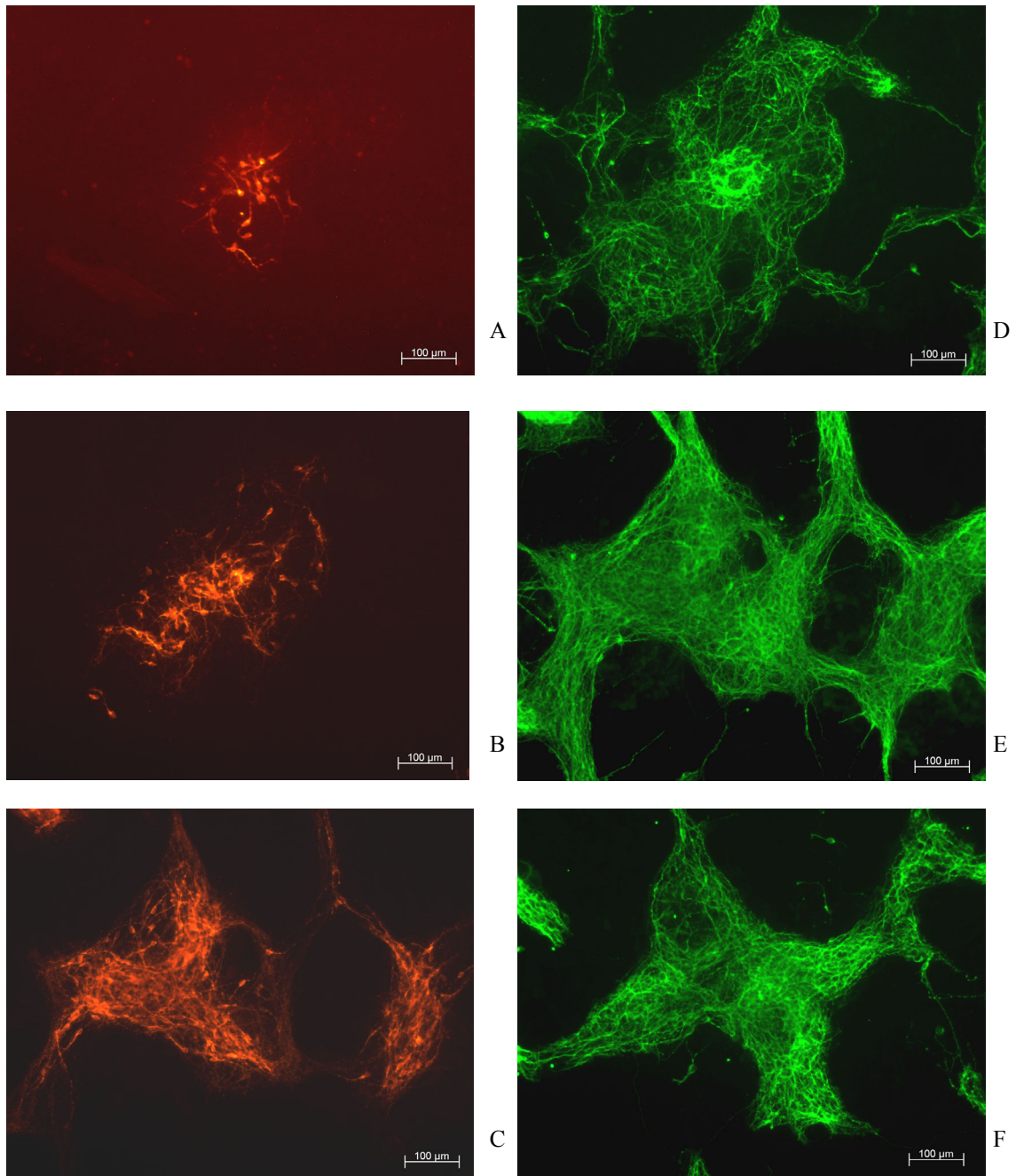


Abb. 3.25. **Immunzytochemische Markierung**

(A-C) gegen die Tyrosin-Hydroxylase (TH) sowie (D-F) gegen β -Tubulin Typ III (TuJ1). Dargestellt wird die Differenzierung neuraler Progenitoren (E11-12) zu Neuronen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. (A, D) 2 Tage; (B, E) 5 Tage; (C, F) 7 Tage in Kultur.

3.2.2.2. Expressionsanalyse der Markergene

Zur Charakterisierung des Entwicklungsprofils während der 7tägigen Differenzierung durch die Analyse der Genexpression wurden spezifische Primer eingesetzt, welche die Entwicklung verschiedener Zellsubtypen beschreiben. Dabei wurden die Primersequenzen folgender Zielgene verwendet: Tyrosin-Hydroxylase (TH), fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP), Neurofilament (*middle chain*) (NFm) sowie Nestin, welche in Tabelle 2 näher beschrieben wurden. Zur semi-quantitativen Bewertung der Proben wurde auch hier das *housekeeping*-Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Ergebnisse wurden durch die Gelaufnahme in Abb. 3.26. dokumentiert. Während die Tyrosin-Hydroxylase wiederholt als Marker dopaminerger Neurone eingesetzt wurde, stellten die Sequenzen von GFAP, NFm und Nestin die Markergene der Intermediärfilamente neuronaler Zellen dar. Dabei charakterisierte GFAP die Entwicklung glialer Zelltypen, insbesondere der Astrozyten im Zellkultur-gemisch. Auch durch die Expression des Neurofilaments sollte die Entwicklung des neuronalen Zytoskeletts mit beschrieben werden.

In Abb. 3.26. sind die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und photographiert worden. Mit Hilfe eines Längenstandards (100 bp - 5000 bp) konnte die Größe der linearen DNA-Fragmente identifiziert werden. Wie zu erwarten war, ergaben sich folgende genspezifische Fragmentgrößen: TH (414 bp), GFAP (429 bp), NFm (596 bp), Nestin (217 bp), GAPDH (452 bp).

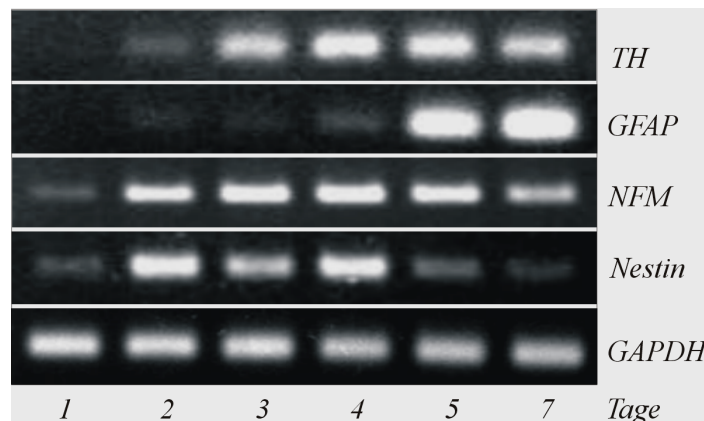


Abb. 3.26. **Expressionsanalyse der Markergene** Tyrosin-Hydroxylase (TH), fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP), Neurofilament (*middle chain*; NFm), Nestin sowie das *housekeeping*-Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) mittels semi-quantitativer RT-PCR. In einer 7tägigen Kultivierung wurden neurale Progenitoren (E11-12) *in vitro* differenziert. Dargestellt werden die Banden der Bestimmungen nach 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Tagen zweier unabhängiger Kultivierungen mit 3 Wiederholungen.

Betrachtet man zunächst die Bandenintensitäten der TH-Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, so lässt sich ein deutliches Entwicklungsprofil erkennen. Auch hier konnte, wie in Abb. 3.24., ein Anstieg der TH-Expression beobachtet werden, welcher bereits am 4. Tag ein Maximum aufwies. An den folgenden Tagen wurde ein Rückgang der Intensitäten deutlich, welcher am 7. Tag ungefähr der Expression des 3. Tages entsprach. Die Entwicklung der GFAP-Expression stieg hingegen bis zum letzten Tag der Differenzierung an und zeigt sehr hohe Bandenintensitäten. Als weiterer Marker neuronaler Zellen wurde Neurofilament (NFm) eingesetzt, welches ebenfalls einen Anstieg der Genexpression aufwies. Jedoch konnte auch hier, wie bei der Tyrosin-Hydroxylase nach 4tägiger Kultivierung eine Unterregulation beobachtet werden.

Außer der Untersuchung neuronaler Markergene war es von Interesse, inwieweit die Progenitoren ihren Stammzellcharakter während der Differenzierung beibehalten oder verlieren. Aus diesem Grund wurde als Markergen Nestin verwendet. Die Bandenintensitäten wiesen insgesamt einen Rückgang der Expression bis zum 7. Tag der Kultivierung auf. Dies deutete auf einen Verlust des Stammzellcharakters hin, da die Zellen in spezifische Zellsubtypen ausdifferenzierten. Es war aber auch zu erkennen, dass Nestin am 1. Tag kaum eine Expression aufwies, welche dann am 2. Tag sprunghaft erhöht war. Die Zellen befanden sich somit im undifferenzierten Zustand zu Beginn der Kultivierung, was jedoch am 1. Tag nicht nachgewiesen werden konnte. Auch in vorangegangenen Untersuchungen mittels immunzytochemischer Markierung, welche innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte eine Abnahme Nestin-positiver Zellen während der Differenzierung bestätigt werden. Alle Expressionen wurden nach dem Abgleich der GAPDH-Bandenintensitäten beurteilt, dessen Expression in der untersten Reihe der Abbildung dargestellt wurde.

In weiteren Versuchsdurchführungen wurden die Zellen in dem zuvor beschriebenen bioFolie-Membransysteme kultiviert, um den Einfluss eines erhöhten oxidativen Stresses zu untersuchen. Dieser konnte durch eine erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit induziert werden, da Sauerstoff direkt durch die gaspermeable bioFolie-Membran diffundieren konnte. Dabei sollten sowohl der Metabolismus der Zellen, spezifische Zellmarker sowie Genexpressionsanalysen zu einer umfangreichen Zellcharakterisierung beitragen.

3.3. Charakterisierung der Stoffwechselleistung neuraler Progenitoren in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Es ist bereits beschrieben worden, dass die selektive Degeneration nigrastriataler Dopaminneurone unter anderem durch Apoptose verursacht werden kann, wobei oxidativer Stress und die Zytotoxizität reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) von zentraler Bedeutung sind [Bowling und Beal, 1995; Jenner und Olanow, 1996].

Da das beschriebene bioFolie-Membransystem bereits Einflüsse auf die Stoffwechselleistungen der GOS-3- bzw. der PC-12-Zelllinien zeigte, wurden auch die neuronalen primären Kulturen unter vergleichbaren Kulturbedingungen differenziert. Dabei stand im Vordergrund, den Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen zu untersuchen. Außerdem sollte vergleichend dargestellt werden, wie sich die Supplementierung von Ascorbinsäure (Vitamin C) auf die Differenzierung in beiden Zellsystemen auswirkt. Ascorbinsäure ist ein biologisches Antioxidantium und wirkt als Schutz gegen reaktive Sauerstoff-Spezies in den Zellen.

3.3.1. Glukose- und Laktatkonzentration

Zur Beurteilung des metabolischen Status der Zellkulturen ist die Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentrationen relevant, welche im Medienüberstand der jeweiligen Ansätze nach einer Kultivierungsdauer von 3, 5 und 7 Tagen gemessen wurden. Dazu wurden die neuronalen Progenitoren nach einer 6tägigen Proliferation dissoziiert und mit einer Zelldichte von 15.000 Zellen/Well rekultiviert. Die Inkubation erfolgte in Multiwellplatten sowie vergleichend im bioFolie-Membransystem bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (5%, 21%). Die Differenzierung der Zellkulturen fand in Medium (DMEM/F12/1% FCS) mit und ohne Ascorbinsäure statt.

3.3.1.1. Glukose- und Laktatkonzentrationen ohne Antioxidantium

Die ermittelten zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate sowie Laktatbildungsrate wurden zusammenfassend in Abb. 3.27. graphisch dargestellt. Aus dem Diagramm der zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate wurde deutlich, dass der Verbrauch an Glukose aller Zellkulturansätze in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer weitgehend stabil blieb. Dabei wurden Raten zwischen $19,89 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen und $25,12 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen erreicht. Betrachtet man jedoch explizit die Glukoseverbrauchsrate nach einer 7tägigen Kultivierung, so war ein Effekt der Sauerstoffverfügbarkeit auf den Metabolismus der Zellen zu erkennen. Dieser spiegelte sich in einer kontinuierlichen Abnahme der Verbrauchsrate mit Zunahme der Sauerstoffkonzentration wider. Während in der Kultur geringster Sauerstoffmengen eine maximale Rate von $25,12 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (in Multiwellplatten bei 5% O_2) ermittelt wurde, sank dieser Wert bei sehr hohem Sauerstoffgehalt (im bioFolie-Membransystem bei 21% O_2) bis auf $20,46 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen ab. Wenn auch keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren, so konnte ein tendenzieller Einfluss des Sauerstoffgehalts gezeigt werden.

Hingegen ließ sich aus den graphischen Darstellungen der Laktatbildungsrate eine eindeutigere Aussage treffen. Die Laktatbildungsrate stieg über eine 7tägige Kultivierungsdauer bei geringer Sauerstoffkonzentration (5% O_2) insgesamt an, während die der Kulturansätze bei 21% O_2 weitgehend stabil blieb.

Vergleicht man zunächst die täglichen Bildungsrate an Laktat in Multiwellplatten bei 5% O_2 und 21% O_2 miteinander, so ergab sich eine deutliche Abnahme der Rate mit steigendem Sauerstoffgehalt. Obgleich der Einfluss sich nach 3 Tagen in Kultur nicht signifikant abzeichnete, so war der Unterschied der Laktatakkumulation am 5. und 7. Tag sehr ausgeprägt. Es konnten Maximalwerte von $11,59 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (Tag 7 bei 5% O_2) ermittelt werden, welche mit steigendem Sauerstoffgehalt auf Minimalwerte von $6,46 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (Tag 7 bei 21% O_2) absanken.

Im bioFolie-Membransystem konnten ein ähnliches Stoffwechselverhalten in der Laktatbildung beobachtet werden. Auch hier wurde eine signifikante Abnahme der Laktatakkumulation ermittelt, wobei sich durchschnittliche Rate von $10,41 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (Tag 7 bei 5% O_2) und $3,96 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (Tag 7 bei 20% O_2) ergaben. In jedem Ansatz waren die Laktatbildungsrate im bioFolie-Membransystem geringer als bei Kulturen in Multiwellplatten.

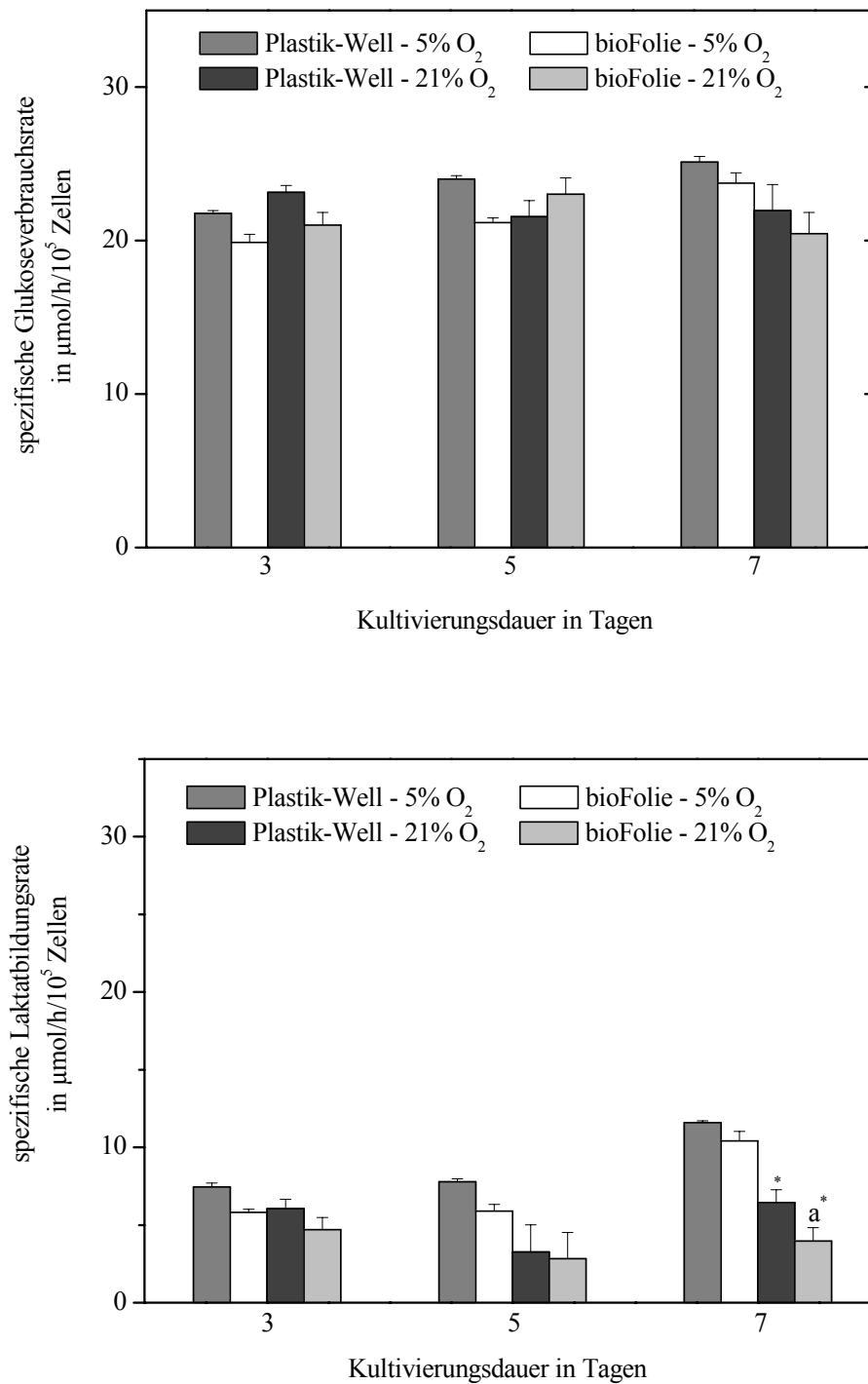


Abb. 3.27. **Zellspezifische Glukoseverbrauchsrate** (oberer Graph) und **Laktatbildungsrate** (unterer Graph) neuraler Progenitoren nach einer 7tägigen Kultivierung in Differenzierungsmedium ohne Zusatz von Antioxidantien. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend am 7. Tagen wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 5% O₂ und 21% O₂. (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix.

3.3.1.2. Glukose- und Laktatkonzentration mit Ascorbinsäure

Die Experimente sollten zeigen, inwieweit die Supplementierung von 200 μM Ascorbinsäure einen Einfluss auf den Metabolismus und die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen hat. Dabei wurden neurale Progenitoren unter gleichen Bedingungen (in Multiwellplatten und im bioFolie-Membransystem bei 5% O_2 und 21% O_2) kultiviert, wobei dem Differenzierungsmedium Ascorbinsäure zugesetzt wurde.

Betrachtet man die graphische Darstellung der zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate in Abb. 3.28., so konnten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Kulturmatrix, der Sauerstoffkonzentration oder der Kultivierungszeit beobachtet werden. Vergleichende Studien an einzelnen Kultivierungstagen zeigten einen stabilen Umsatz an Glukose, wobei sich eine durchschnittliche Verbrauchsrate von $20,6 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen ergab.

Betrachtet man die Ansätze in Multiwellplatten bei variierenden Sauerstoffkonzentrationen, so konnte eine Stabilisierung der Glukoseverbrauchsrate bei 5% O_2 ermittelt werden, wobei nach 7tägiger Kultivierung ein Maximalwert von $22,46 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen erreicht wurde. In Kulturen bei 21% O_2 zeichnete sich hingegen eine Abnahme der Raten bis auf $18,18 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen ab. Ähnliche Stoffwechselleistungen wurden in den bioFolie-Membransystemen beschrieben, wobei keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten.

Die ermittelten Werte der Laktatbildungsraten lassen auch hier Stoffwechselveränderungen deutlicher erkennen. In den Kulturansätzen in Multiwellplatten war eine geringe Abnahme der Laktatakkumulation im Medium durch steigende Sauerstoffverfügbarkeiten zu erkennen, wobei der Einfluss mit der Kultivierungsdauer zunahm. Erhöhte Laktatbildungsraten nach 7tägiger Kultivierung ergaben Werte von $9,95 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (bei 5% O_2) sowie $8,42 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen (bei 20% O_2). Vergleicht man nun die Ansätze im bioFolie-Membransystem bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen miteinander, so konnte bei 5% O_2 eine Zunahme der Raten bis zu $6,77 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen verzeichnet werden. Im Gegenteil dazu nahm die Laktatbildungsrate in Kulturen bei 21% O_2 signifikant bis auf $3,59 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen ab.

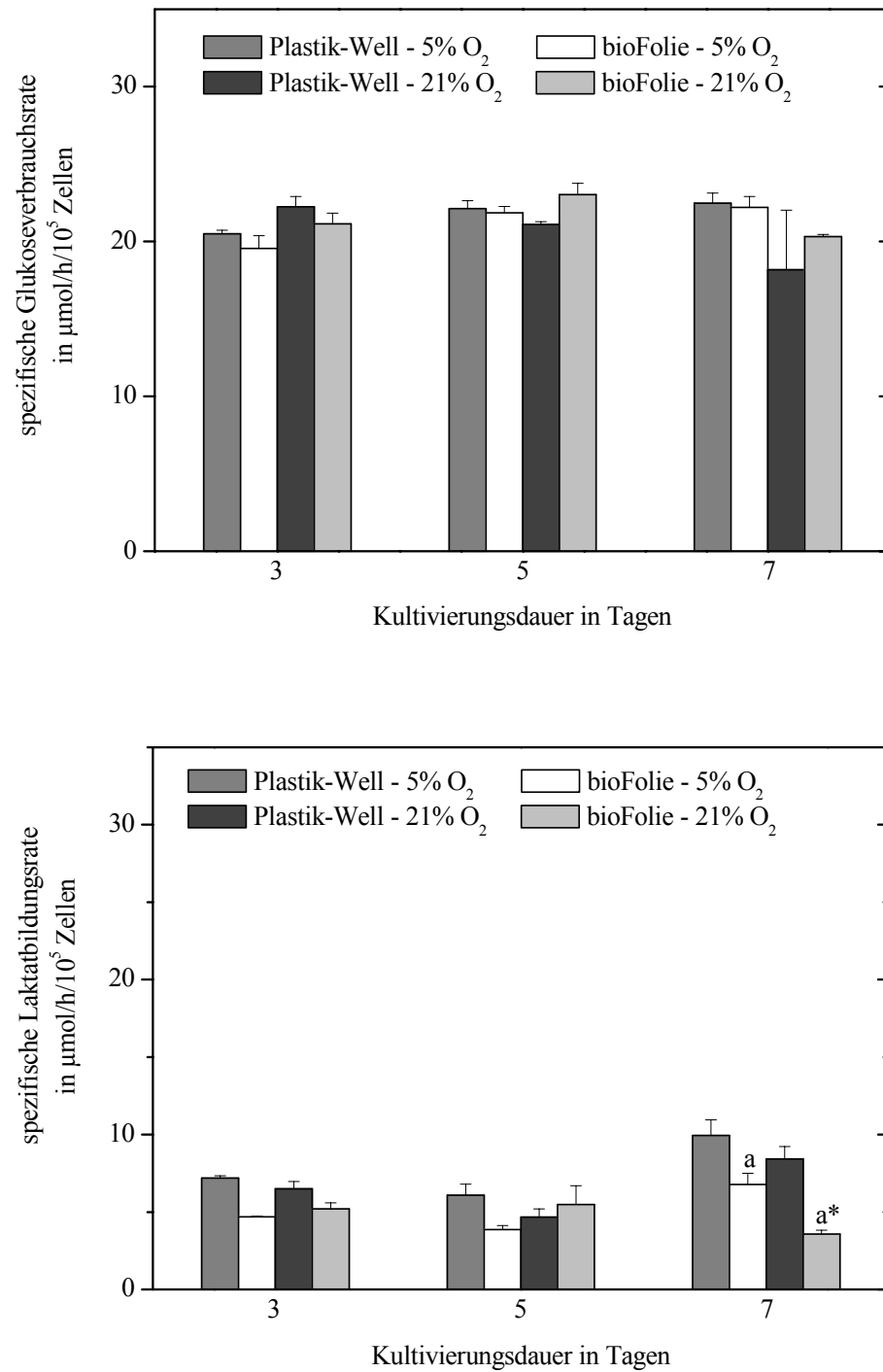


Abb. 3.28. **Zellspezifische Glukoseverbrauchsrate** (oberer Graph) und **Laktatbildungsrate** (unterer Graph) neuraler Progenitoren nach einer 7tägigen Kultivierung in Differenzierungsmedium mit Zusatz von Ascorbinsäure (200 μM) als Antioxidantium. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Kultivierungen mit 3-4 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend am 7. Tagen wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 5% O_2 und 21% O_2 . (*) 5%/21% O_2 auf gleicher Matrix.

3.3.2. Expressionsanalyse des Markergens Tyrosin-Hydroxylase

Wie auch in den PC-12-Zellkulturen, welche als neuronales Zellmodell dienten, erfolgte auch in Kulturen neuraler Progenitorzellen eine Charakterisierung des Regulationsprofils der Tyrosin-Hydroxylase mittels quantitativer *Real Time* PCR. Auch hier konnten die vorangegangenen Analysen mittels semi-quantitativer RT-PCR keine eindeutigen Regulationsunterschiede zeigen.

Das Ziel bestand in einer vergleichenden Bestimmung der Kulturansätze neuraler Progenitoren im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ und 21% O₂. Anhand der Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche, welche in Abb. 3.29. dargestellt sind, ließ sich eine signifikante Unterregulation des Tyrosin-Hydroxylase-Gens mit Zunahme des Sauerstoffgehalts aufweisen. Somit konnte eine Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Expression von 0,8 pg bei 5% O₂ und 0,2 pg pro ng Gesamt-RNA in Kulturen bei 21% O₂ berechnet werden. Auch hier diente der spezifische Plasmid-DNA-Standard zur Quantifizierung, wobei GAPDH als *housekeeping*-Gen verwendet wurde.

Vergleicht man die ermittelten Daten mit denen des PC-12-Zellsystems in Abb. 3.9., so ließ sich ein deutlich höherer Sauerstoffeinfluss auf die TH-Expression primärer Zellkulturen beobachten.

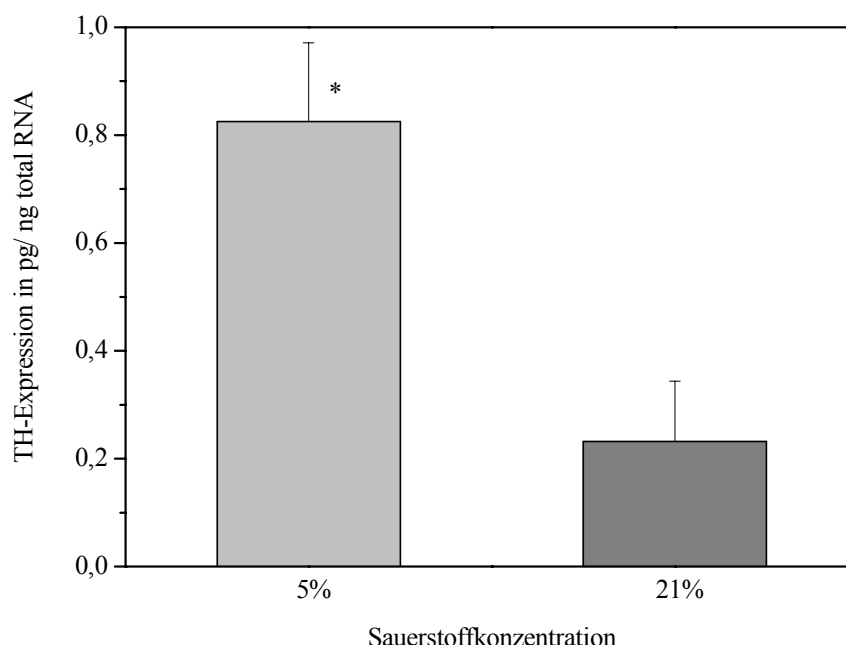


Abb. 3.29. **Quantitative *Real Time* PCR** zur Bestimmung der TH-Expression nach einer 7tägigen Kultivierung neuraler Progenitoren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Kultivierungen mit 3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix.

3.3.3. Dopaminkonzentration im Medienüberstand

Nachdem ein deutlicher Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen in den vorangehenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, wurde die Sekretion des Katecholamins Dopamin im Medium analysiert. Dabei wurden Medienproben der zuvor beschriebenen Kulturen täglich entnommen und chromatographisch mittels HPLC untersucht. Somit ergaben sich die in Abb. 3.30. zusammengefassten Dopaminkonzentrationen der Kulturen im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ und 21% O₂.

Betrachtet man zunächst die Dopaminsekretion bei 5% O₂ in Abhängigkeit von der 7tägigen Kultivierungsdauer, so konnte eine Zunahme der Konzentrationen im Medienüberstand bis zum 4. Kultivierungstag verzeichnet werden. Diesem folgte die signifikante Abnahme der Konzentrationen bis zum Ende der Kultivierung, wodurch in etwa der Ausgangszustand von 490 pg/ml erreicht wurde. Nach 4tägiger Kultivierung wurde eine Maximalkonzentration von 942 pg/ml ermittelt. Im Vergleich dazu wiesen die Kulturen bei 21% O₂ eine stabile Dopaminsekretion bis zum 5. Tag der Kultivierung auf. Anschließend kam es zu einem deutlichen Abfall der Dopaminkonzentration bis auf einen Minimalwert von 177 pg/ml. Während die Konzentrationen beider Kulturansätze bis zum 3. Tag ähnlich waren, konnte nach 7tägiger Kultivierung ein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Diese Ergebnisse wurden in Abb. 3.31. explizit dargestellt, um auf eine signifikant geringere Dopaminkonzentration im Medienüberstand der Kulturen bei 21% O₂ hinzuweisen. Dabei wurden durchschnittliche Werte von 459,60 pg/ml (5% O₂) und 177,70 pg/ml (5% O₂) ermittelt, womit sich ein Differenzfaktor von 2,6 ergab. Durch die Zunahme der Differenzen der Dopaminkonzentrationen zwischen den Kulturen bei 5% O₂ und 21% O₂ mit fortschreitender Kultivierungsdauer, wurde ein intensiver Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Stoffwechselleistung neuronaler Zellkulturen deutlich.

Vergleicht man diese Dopaminexpressionen mit denen der PC-12-Zellen (Abb. 3.10.), so wurde auch hier ein ähnliches Konzentrationsverhältnis unter gleichen Bedingungen festgestellt. Dennoch konnte der Vergleich der Expressionen in den PC-12-Zellen lediglich mit einem Differenzfaktor von 1,9 beschrieben werden. Auch hier kann die Aussage getroffen werden, dass der Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen in primären neuronalen Zellsystemen embryonaler Progenitoren höher ist als in PC-12-Zellkulturen.

Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, wie auch bei der Analyse in PC-12-Zellkulturen (Abb. 3.10.), dass es sich um eine Autoxidation des Dopamins bei Anwesenheit hoher Sauerstoffkonzentrationen handeln könnte.

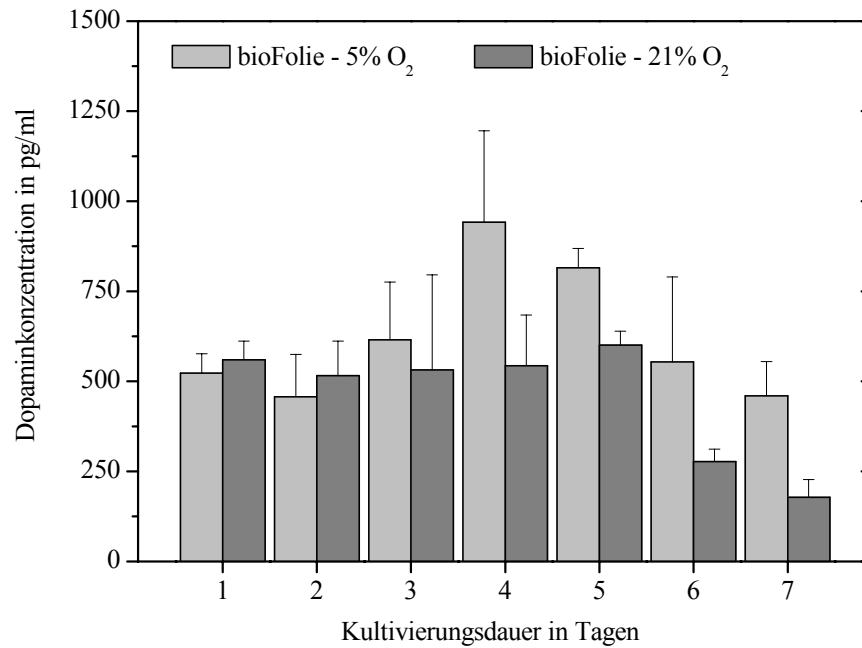


Abb. 3.30. **Dopaminkonzentration** im Medienüberstand während einer 7tägigen Kultivierung neuraler Progenitoren im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ und 21% O₂. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Kultivierungen mit 3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM.

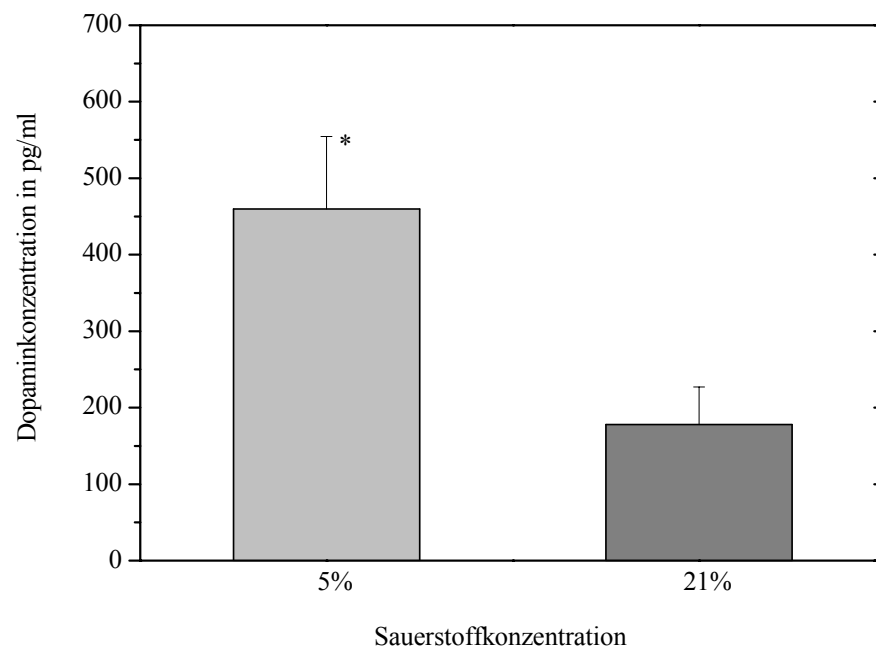


Abb. 3.31. **Dopaminkonzentration** im Medienüberstand nach einer 7tägigen Kultivierung neuraler Progenitoren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Kultivierungen mit 3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (*) 5%/21% O₂ auf gleicher Matrix.

3.3.4. Sauerstoffeinfluss auf die Differenzierung neuronaler Zellen

Zur quantitativen Bestimmung der differenzierten Neurone wurde die Anzahl der TuJ1-positiven Zellkörper mit Hilfe eines Zählgitters in einem definierten Bereich (mittig der Zellkultur) ermittelt. Die Ergebnisse wurden graphisch zusammengefasst und in Abb. 3.32. dargestellt, wobei der obere Graph die Werte der Kultivierungen bei 5% O₂ und der untere Graph der Kultivierungen bei 21% O₂ enthält.

Im oberen Graph ist zu erkennen, dass in beiden Kultursystemen (in Multiwellplatten und im bioFolie-Membransystem) bei 5% O₂ ein leichter Anstieg der TuJ1-positiven Zellen während einer 7tägigen Differenzierung zu verzeichnen war. Dabei konnten etwa 3-4% der Gesamtzellzahl immunzytochemisch mit anti- β -Tubulin Typ III (TUJ1) detektiert und als Neurone identifiziert werden. Wenn sich auch keine signifikanten Unterschiede ergaben, so war doch zu beobachten, dass sich eine erhöhte Anzahl an Neuronen bei einer Supplementierung von 100 - 200 μ M Ascorbinsäure abzeichnete. Hingegen sanken die Neuronenzahlen durch Zugabe erhöhter Konzentrationen wieder ab. Es war auch zu erkennen, dass die Differenzierung zu neuronalen Zellen im bioFolie-Membransystem scheinbar schlechter verlief, als in Multiwellplatten. Dies machen die vergleichsweise geringeren Neuronenzahlen im bioFolie-Membransystem deutlich.

Betrachtet man nun den unteren Graph gleicher Kulturen bei 21% O₂, so kann die Aussage getroffen werden, dass die Neuronenzahlen mit steigender Ascorbinsäurekonzentrationen tendenziell abnahmen. Hierbei konnte ein Neuronenanteil von 3-5% ermittelt werden, wobei keine Signifikanzen zu erkennen waren.

Vergleicht man die Kulturansätze bei beiden Sauerstoffkonzentrationen untereinander, so waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Diese Aussage wird durch die exemplarischen Abbildungen 3.33. der immunzytochemischen Markierungen gegen β -Tubulin Typ III unterstützt. Wenn auch der Anteil der Neuronen von der Gesamtzellzahl durch einen erhöhten Sauerstoffgehalt nicht deutlich beeinflusst wurde, so haben morphologische Beobachtungen gezeigt, dass die Axone der neuronalen Zellen bei 21% O₂ weniger ausgeprägt waren.

Die Auswertungen ließen darauf schließen, dass die Sauerstoffkonzentrationen keinen eindeutigen Einfluss auf die Differenzierung zu Neuronen in den *in vitro* Systemen neuraler Progenitoren haben. Hingegen schien eine geringe Wirkung des Ascorbinsäurezusatzes gegeben zu sein.

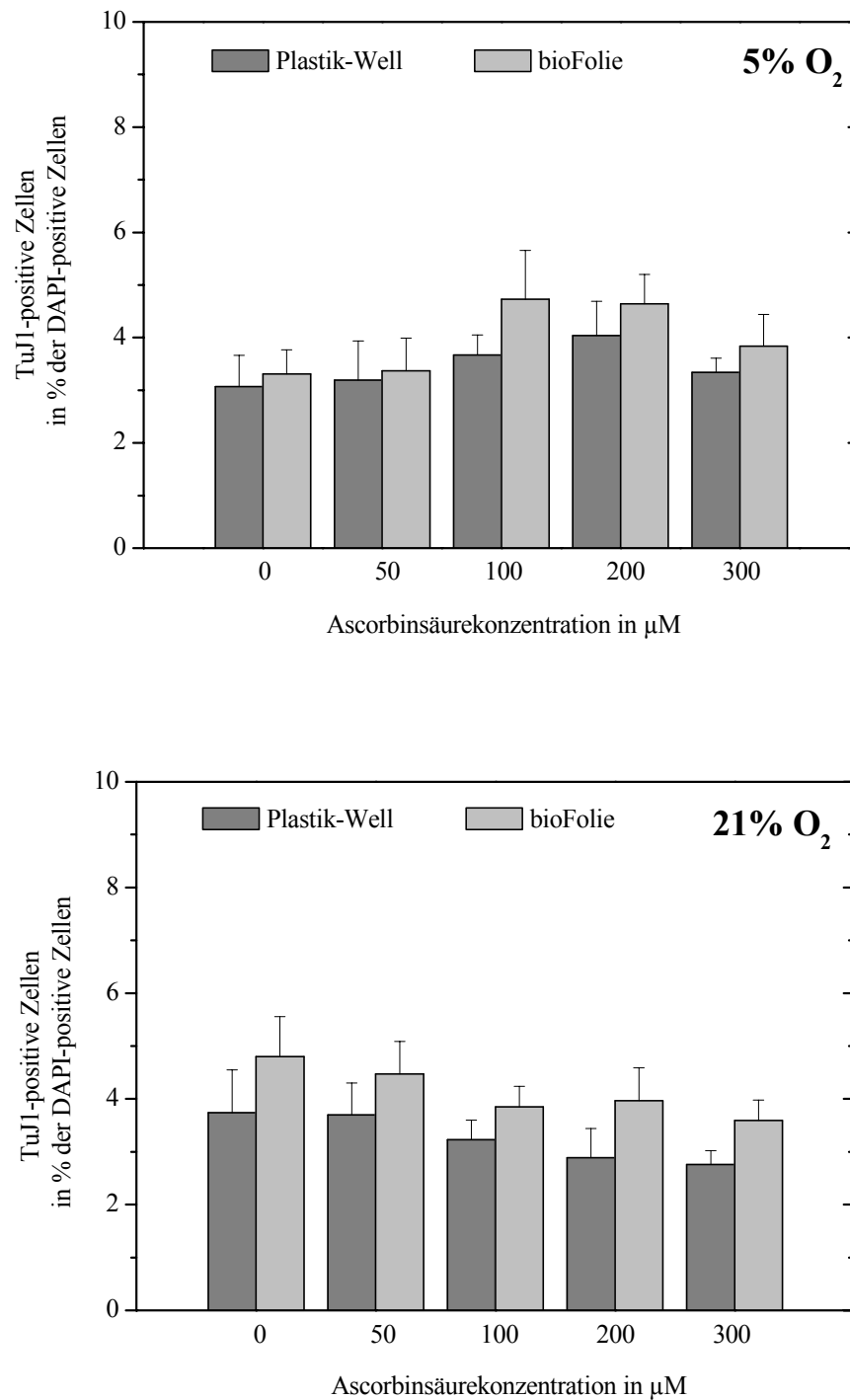


Abb. 3.32. **Quantifizierung der immunzytochemischen Markierungen** gegen β -Tubulin Typ III (TuJ1) in Abhängigkeit von der Konzentration der zugesetzten Ascorbinsäure. Die neuralen Progenitoren wurden für 7 Tage in Multiwellplatten sowie im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ oder 21% O₂ differenziert. Die Gesamtzellzahl wurde durch die Kernfärbung gegen DAPI ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Kultivierungen mit 2-3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM.

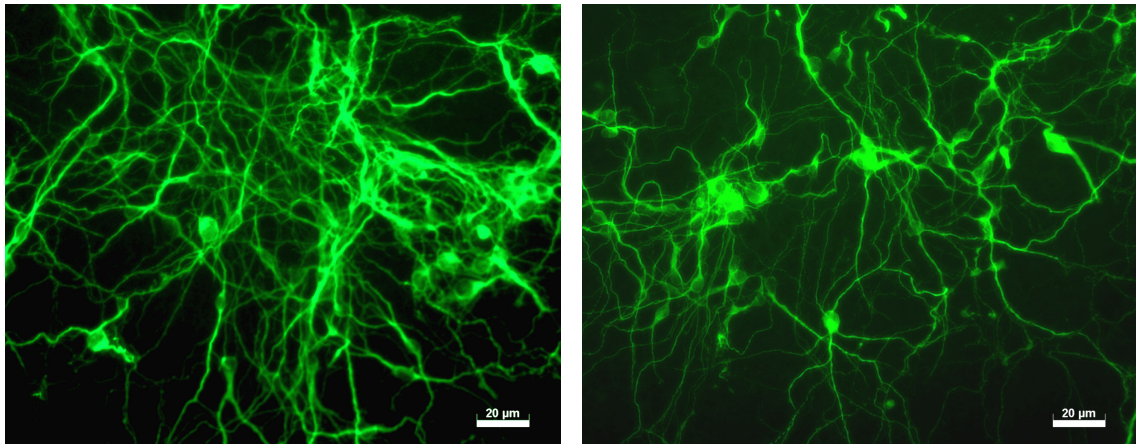


Abb. 3.33. **Immunzytochemische Markierung** gegen β -Tubulin Typ III (TuJ1) in Multiwellplatten bei 5% O₂ (links) und bei 21% O₂ (rechts) unter Zusatz von 200 μ M Ascorbinsäure.

3.3.5. Sauerstoffeinfluss auf die Differenzierung dopaminergener Neurone

Da das hauptsächliche Interesse der Differenzierung zu dopaminergen Neuronen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration galt, wurden die zuvor beschriebenen Kulturen parallel gegen Tyrosin-Hydroxylase markiert. So konnten Zellen, welche sowohl TuJ1- als auch TH-positiv markiert wurden, als dopaminerge Neurone identifiziert werden. Der Graph in Abb. 3.34. stellt die prozentualen Anteile TH-positiver Zellen von der Gesamtzellzahl neuronaler Zellen dar.

Betrachtet man die Kulturen bei 5% O₂ in Abb. 3.34. (oberer Graph), so ist insgesamt ein Anstieg der dopaminergen Zellen mit zunehmender Ascorbinsäurekonzentration zu erkennen. Dabei konnte ein maximaler Anteil TH-positiver Zellen von 21% durch die Supplementierung von 300 μ M Ascorbinsäure in Multiwellplatten erreicht werden. Vergleicht man die Kultursysteme in den einzelnen Ansätzen miteinander, so war die Anzahl TH-positiver Zellen im bioFolie-Membransystem bis zu 50% geringer. Mit steigender Konzentration des Antioxidantiums nahmen diese Differenzen ab. Dabei lag der Anteil dopaminergener Zellen (im bioFolie-Membransystem) bei einem Zusatz von 300 μ M Ascorbinsäure lediglich 6,7% unter dem der Kulturen in Multiwellplatten. Es ergab sich ein prozentualer Gehalt von 19,5% an dopaminergen Neuronen in den Kulturen im bioFolie-Membransystem.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass die Supplementierung erhöhter Ascorbinsäurekonzentrationen den Einfluss hoher Sauerstoffverfügbarkeit (im bioFolie-Membransystem) limitieren konnte.

Im Vergleich dazu wurden in allen Kulturansätzen bei 21% O₂ (Abb. 3.34. unterer Graph) geringere Anzahlen an TH-positiven Zellen ermittelt. Anhand der analytischen Auswertungen der Kulturen in Multiwellplatten wurde zunächst deutlich, dass auch hier der Zusatz der Ascorbinsäure im Vergleich zur Kontrolle (ohne Antioxidantium) einen positiven Einfluss auf die Differenzierung hatte. Dies zeichnete sich durch den Anstieg der TH-positiven Zellzahlen bis auf 13% der Neuronenzahl bei 100 µM Ascorbinsäure ab. Jedoch sank dieser Anteil durch Zusatz von 200 µM bzw. 300 µM Ascorbinsäure leicht ab.

Bei der Kultivierung im bioFolie-Membransystem konnte im Gegensatz zu allen anderen Ansätzen keine Wirkung der Ascorbinsäurezugabe gezeigt werden. Alle Kulturen wiesen prozentuale Anteile an dopaminergen Neuronen von 3-5% auf, welche um durchschnittlich 66% unter denen der Zellkulturen in Multiwellplatten lagen. Es wurde deutlich, dass mit steigender Sauerstoffverfügbarkeit der Anteil an dopaminergen Zellen in der Kultur abnahm. Dieser Einfluss konnte bei geringeren Sauerstoffeinflüssen, wie bei 5% O₂ durch die Zugabe des Antioxidantiums, limitiert werden. Mit steigender Sauerstoffverfügbarkeit (bei 21% O₂, vor allem im bioFolie-Membransystem) ließ die Wirkung der Ascorbinsäure nach.

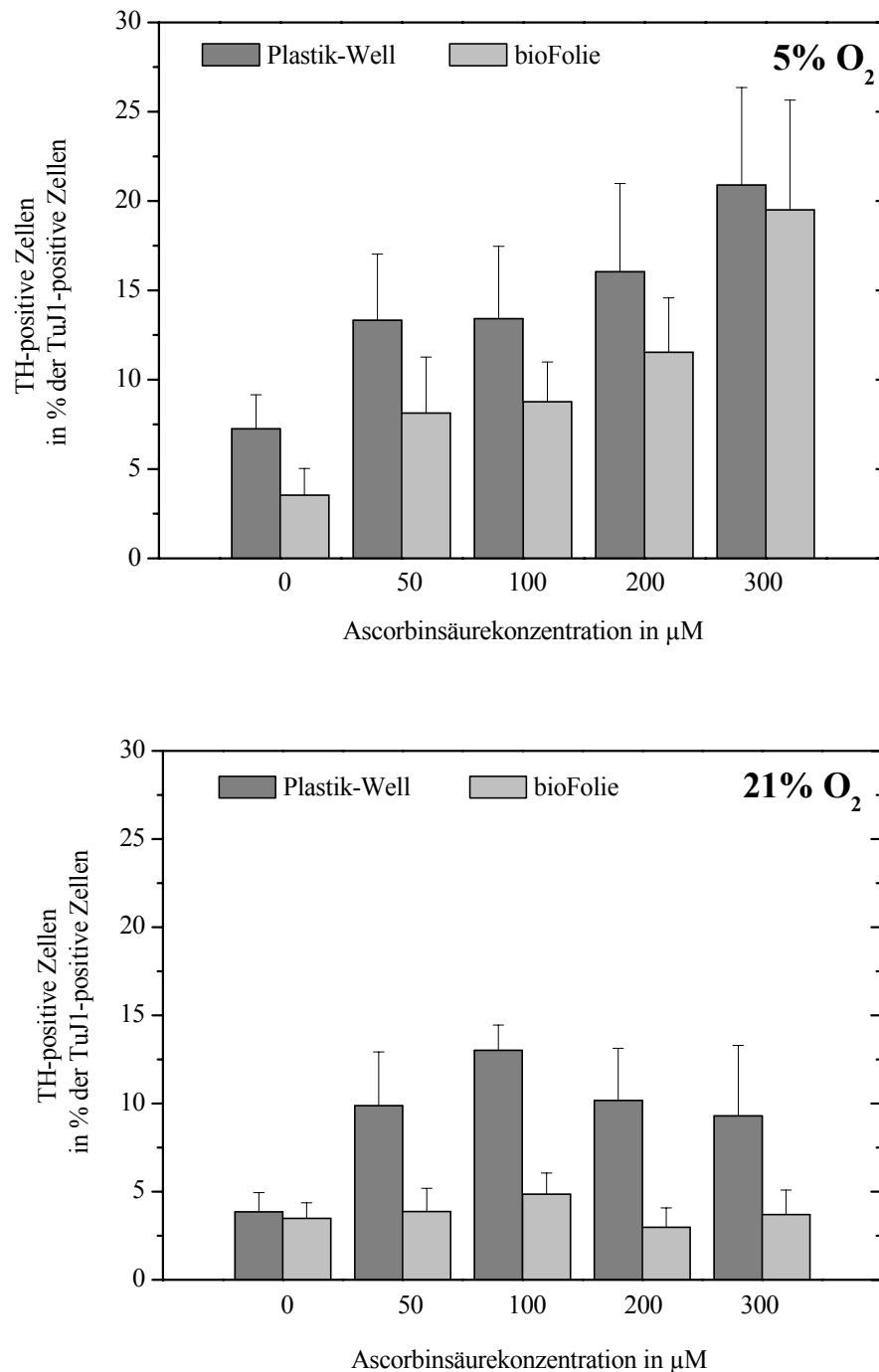


Abb. 3.34. **Quantifizierung der immunzytochemischen Markierungen** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) und β -Tubulin Typ III (TuJ1) in Abhängigkeit von der Konzentration der zugesetzten Ascorbinsäure. Die neuralen Progenitoren wurden für 7 Tage in Multiwellplatten sowie im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ oder 21% O₂ differenziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Kultivierungen mit 2-3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (a) Well/bioFolie jeweils bei 5% O₂ und 21% O₂.

3.3.6. Vergleich des Sauerstoffeinflusses auf die Differenzierung dopaminerges Neurone

In Abb. 3.35. wurden die prozentualen Anteile TH-positiver Zellen von der Gesamtzellzahl TuJ1-positiver neuronaler Zellen dargestellt, wobei der Vergleich der beiden Sauerstoffkonzentrationen im Vordergrund steht. Die Daten ergeben sich aus den in Abb. 3.34. gezeigten Ergebnissen (ohne und unter Zusatz von 200 μ M Ascorbinsäure).

In den Kulturansätzen auf herkömmlichen Multiwellplatten (Abb. 3.35. oberer Graph) war zu erkennen, dass erhöhte Sauerstoffkonzentrationen unabhängig vom Ascorbinsäuregehalt des Medium, eine Reduktion der Differenzierung dopaminerges Neurone aufwiesen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Supplementierung von 200 μ M Ascorbinsäure in Kulturen bei 5% O₂ ein signifikanter Anstieg TH-positiver Neurone (Faktor >2) erreicht werden konnte. Dieser Anstieg konnte ebenfalls, wenn auch nicht signifikant, in Kulturen bei 21% O₂ dargestellt werden. Zusammenfassend konnten die Differenzen der beiden Kultursysteme durch die Zugabe von 200 μ M Ascorbinsäure von 47% (ohne Ascorbinsäure) auf 36% reduziert werden.

Betrachtet man die Kulturen im bioFolie-Membransystem (Abb. 3.30. unterer Graph), so konnten ähnliche Aussagen, wie in den Kulturen in Multiwellplatten, getroffen werden. Auch hier zeigte die Zugabe von 200 μ M Ascorbinsäure bei 5% O₂ eine signifikante Steigerung des Anteils an dopaminergen Neuronen. Dennoch lag die Ausbeute an TH-positiven Zellen in diesem System um 28% unter der, der Kulturen in Multiwellplatten. Aus den Kulturen bei 21% O₂ ging hervor, dass die Zugabe der Ascorbinsäure keinen Einfluss auf die Differenzierung hatte. Der Anteil an dopaminergen Neuronen in diesen Kulturansätzen blieb konstant und war im bioFolie-Membransystem signifikant geringer, als in Kulturen bei 5% O₂.

Die immunzytochemischen Markierungen wurden mit mikroskopischen Aufnahmen belegt und sollten die dargestellten Ergebnisse veranschaulichen. Dargestellt wurden dabei vergleichend die Kulturen bei 5% O₂ und 21% O₂ unter Zusatz von 200 μ M Ascorbinsäure in den jeweiligen Kultursystemen (Abb. 3.36. in Multiwellplatten, Abb. 3.37. im bioFolie-Membransystem). Die Beobachtungen zeigten deutlich, dass vor allem bei Sauerstoffkonzentrationen von 21% O₂ die Ausbildung der Axone und Dendriten eingeschränkt war. Das Fehlen neuronaler Fortsätze kann die Weiterleitung von Erregungen und Signalen verhindern.

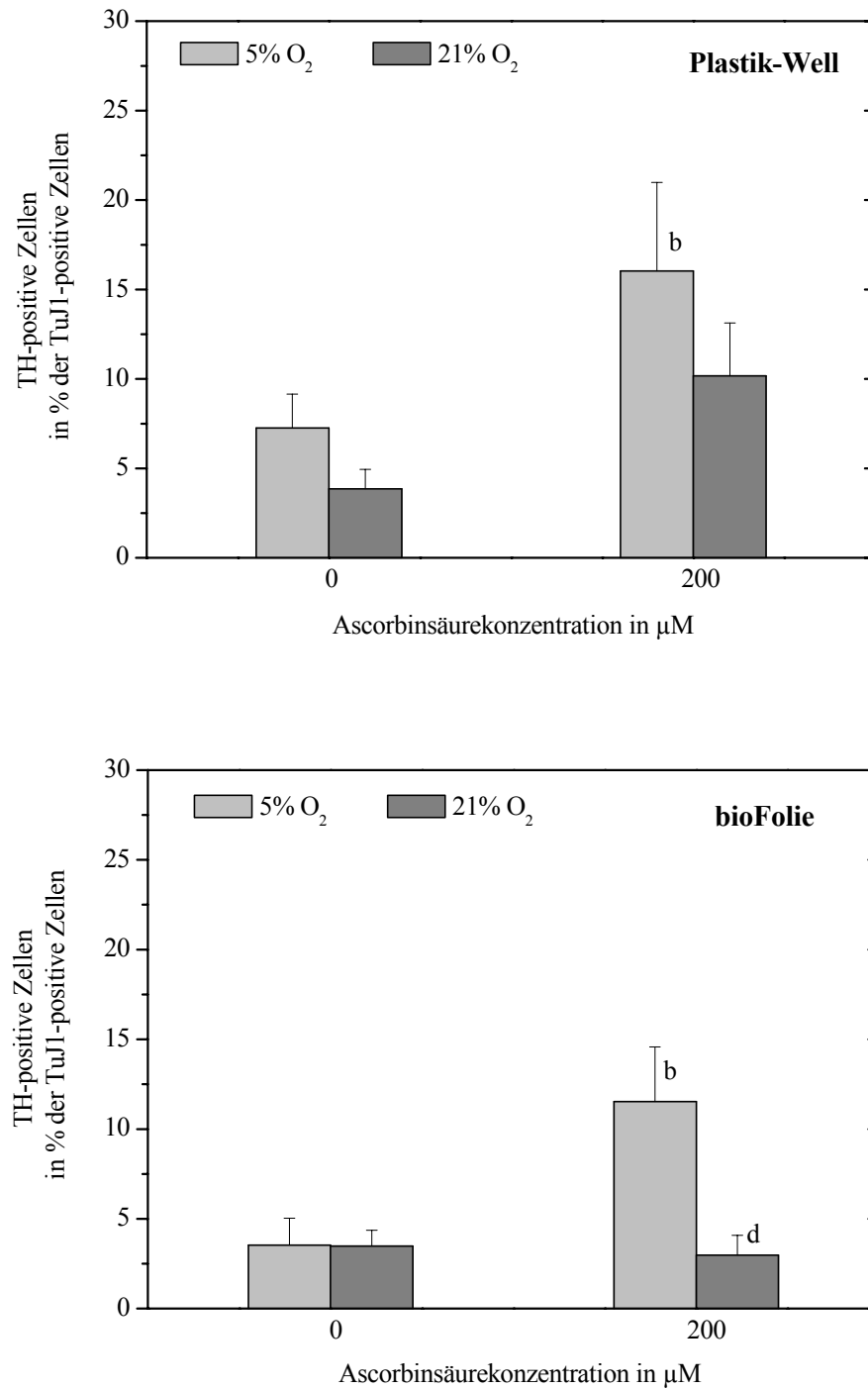


Abb. 3.35. **Vergleich der immunzytochemischen Markierungen** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) und β -Tubulin Typ III (TuJ1) in Kulturen ohne/mit Ascorbinsäure. Die neuronalen Progenitoren wurden für 7 Tage in Multiwellplatten sowie im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ oder 21% O₂ differenziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Kultivierungen mit 2-3 Wiederholungen und der jeweiligen SEM. Signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden vergleichend wie folgt gekennzeichnet: (b) ohne/mit Ascorbinsäure bei 5% O₂ oder 21% O₂ auf gleicher Matrix (c) 5%/21% O₂ ohne Ascorbinsäure auf gleicher Matrix (d) 5%/21% O₂ mit Ascorbinsäure auf gleicher Matrix.

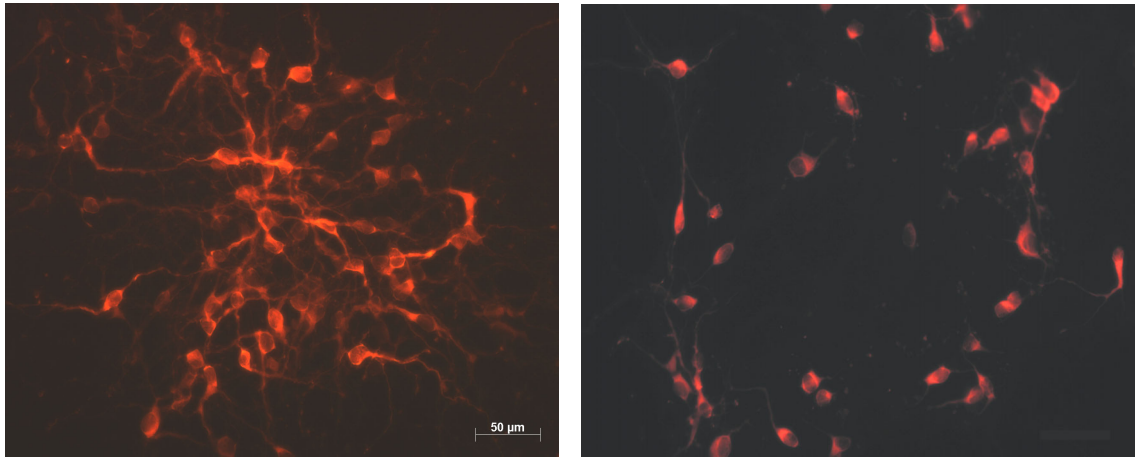


Abb. 3.36. **Immunzytochemische Markierung** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) in Multiwellplatten bei 5% O₂ (links) und bei 21% O₂ (rechts) unter Zusatz von 200 µM Ascorbinsäure.

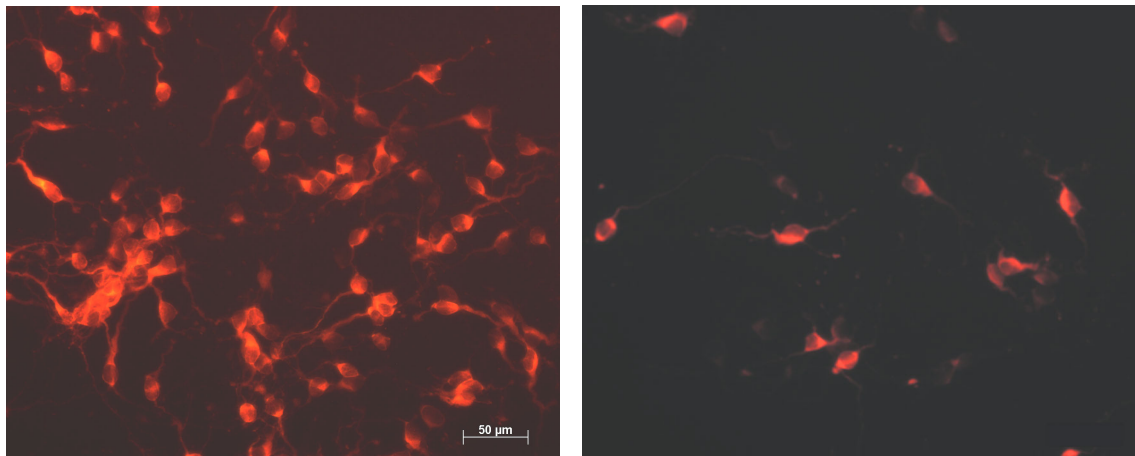


Abb. 3.37. **Immunzytochemische Markierung** gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) im bioFolie-Membransystem bei 5% O₂ (links) und bei 21% O₂ (rechts) unter Zusatz von 200 µM Ascorbinsäure.

4 Diskussion

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen neuraler dopaminerges Zellsysteme sollen zu einem besseren Verständnis der Ursachen der selektiven Degeneration dopaminerges Neurone in der Substantia nigra, welche für Morbus Parkinson kennzeichnend sind, beitragen. Dabei liegt der Schwerpunkt der Studien in der effizienten Differenzierung der neuralen Progenitoren zu den spezifischen Zellsubtypen. Zusätzlich haben zahlreiche Untersuchungen gezeigt, dass apoptotische Mechanismen an der Degeneration dopaminerges Zellen beteiligt sind, weshalb auch diese von Bedeutung sind [Jenner, 1998; Jeon *et al.*, 1999; Martin, 2001].

Das Verständnis der Regulationsmechanismen der Differenzierung aber auch der Apoptose in neuralen Zellen eröffnet neue therapeutische Behandlungsstrategien des Morbus Parkinson Syndroms. So können Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet es ermöglichen, eine Zellquelle zu schaffen, welche als potentieller funktioneller Ersatz degenerierter Dopaminneurone dient.

Zellkulturen bieten die Möglichkeit, an individuellen Zellen den Mechanismus der Degeneration sowie der Regeneration beobachten und analysieren zu können [Ray *et al.*, 1995]. In den letzten Jahren wurden verschiedenste Protokolle und Zellquellen verwendet, um neuronale Zellen zu kultivieren. Potentielle Zellquellen, welche aus diesen Untersuchungen hervorgingen, sind neben den embryonalen Stammzellen auch neurale Progenitorzellen [Lee *et al.*, 2000; Perrier und Studer, 2003].

Die Kultivierung und Differenzierung dieser Zellen birgt die Hoffnung, den Verlust von Nervenzellen, welcher aus einer traumatischen Verletzung oder Degenerationsmechanismen resultiert, zu ersetzen oder zu regenerieren. Bereits seit den 70er Jahren wächst das Interesse an einer therapeutischen Nutzung dieser Zellen, da sie ein viel versprechendes Potential zur Proliferation und Differenzierung zu spezifischen neuronalen Zelltypen (z.B. dopaminerges Neurone) aufweisen [Isacson, 2002; Olanow *et al.*, 2001; Nikkhah, 2001]. Es ist auch hervorzuheben, dass humanes fötales Material bei der Transplantation bei Parkinson Patienten nicht uneingeschränkt zur Verfügung steht, unterschiedliche Qualitäten aufweist und infiziert sein könnte [Bjorklund, 2000; Lindvall und Hagell, 2001]. Durch den Einsatz kontrollierter *in vitro* Kultivierungen neuraler Progenitoren und Stammzellen könnten die aufgeworfenen praktischen Schwierigkeiten sowie ethischen

Problematiken umgangen werden und möglicherweise ein unbegrenzter Zellpool zur Verfügung stehen [Bjorklund, 1999; Lee *et al.*, 2000].

Da funktionelle Neurone bei der Transplantationstherapie in einer hohen Anzahl benötigt werden, sind hohe Proliferationsraten sowie Ausbeuten an dopaminergen Neuronen anzustreben. Dabei spielen verschiedenste Kulturbedingungen eine bedeutende Rolle. So bestimmen exogene Faktoren, wie beispielsweise Kulturmedienbestandteile (Nährstoffe), Gaskonzentrationen der Umgebung sowie die Wahl der Zellkulturmatrix das Überleben, die Proliferation und den Mechanismus der Differenzierung der Progenitoren [Ray *et al.*, 1995; Studer *et al.*, 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurden die genannten Einflussfaktoren während der Proliferation und Differenzierung neuraler, embryonaler Progenitoren des ventralen Mesenzephalons untersucht. Weiterführend wurde analysiert, inwieweit das Entwicklungsstadium (E11-12 und E12-13) der Embryonen die Differenzierung zu Dopaminneuronen beeinflusst. Bislang sind in der Literatur vorrangig Studien durchgeführt worden, welche Embryonen ab dem Entwicklungsstadium E12 verwenden [Ray *et al.*, 1995; Brewer, 1995; Yan *et al.*, 2001; Zeevalk *et al.*, 2000]. Ziel war es dabei, den Einfluss des embryonalen Alters auf die Proliferationskapazität sowie die Differenzierung zu Tyrosin-Hydroxylase (TH)-positiven (dopaminergen) Neuronen darzustellen.

Da der Rolle des oxidativen Stresses, als Mediator des apoptotischen Zelltodes bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer und Parkinson) eine große Bedeutung beigemessen wird, orientiert sich ein Teil der hier beschriebenen Arbeit an dem Einfluss von Sauerstoff auf die Differenzierung. Die Aufgabe bestand darin, proliferierte neurale Progenitoren bei variierender Sauerstoffverfügbarkeit zu differenzieren. Dabei wurde der oxidative Stress nicht nur durch die Kultivierung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (5% und 21%), sondern auch durch die Verwendung des entwickelten bioFolie-Membransystems stimuliert, welches in Abschnitt 2.2.6. detailliert beschrieben wurde. Zusätzlich konzentriert sich die Arbeit auf die Wirkung von Ascorbinsäure (Antioxidantium) in Zusammenhang mit der Differenzierung zu dopaminergen Neuronen.

4.1. *In vitro* Proliferation und Differenzierung embryonaler neuraler Progenitoren

4.1.1. Proliferation

In den durchgeführten Versuchen wurde die Zellteilung der Progenitoren durch exogene Einflüsse des supplementierten bFGF, B27 und N2 unterstützt. In den Untersuchungen von Svendsen *et al.* konnte eine 10fache Vermehrung neuraler Progenitoren durch den Zusatz von B27 erzielt werden, wobei vorrangig das Überleben der Zellen beeinflusst wurde [Brewer, 1995; Svendsen *et al.*, 1995].

Des Weiteren spielt der Zusatz des Wachstumsfaktors bFGF während der Proliferation der Progenitoren eine wesentliche Rolle [Fawcett *et al.*, 1995; Studer *et al.*, 1995]. Im ZNS wird während der embryonalen Entwicklung der Neurone und Gliazellen das Wachstum und die Differenzierung durch trophische Faktoren reguliert. Dabei unterstützt der Wachstumsfaktor bFGF das Überleben verschiedener Zellen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns [Ray *et al.*, 1993]. *In vitro* Studien zeigten seine proliferative und vitalisierende Wirkung auf neurale Zellen [Knüsel *et al.*, 1990; Bouvier und Mytilineou, 1995], aber auch den Einfluss auf die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen [Ferrari *et al.*, 1989]. Es konnte beobachtet werden, dass der Wachstumsfaktor in Konzentrationen von 10-20 ng/ml die Proliferation erhöht, während geringere Konzentrationen (50 pg/ml–1 ng/ml) eher die Zellvitalität erhalten [Ray *et al.*, 1993].

Bezüglich der Proliferationskapazität konnten signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom embryonalen Entwicklungsstadium ermittelt werden. Obgleich deutlich weniger Progenitorzellen aus den Mesenzephalien des früheren Entwicklungsstadiums (E11-12) isoliert werden konnten, wiesen diese Kulturen eine 40% höhere Zellausbeute gegenüber dem Stadium E12-13 auf. Dies könnte einerseits mit einem höheren Proliferationspotential der Progenitorzellen am Anfang der Kultivierung begründet werden. Andererseits ist das Alter der Embryonen ein ausschlaggebender Parameter für das Überleben der Zellen in Kultur, was verschiedenste Transplantationsexperimente gezeigt haben [Fricker *et al.*, 1997]. Je jünger die Embryonen sind, desto höher sind die Überlebensraten der Zellen sowie das Potential zur Proliferation aber auch zur Differenzierung zu spezifischen Zellsubtypen (Neurone, Astrozyten, Gliazellen).

Dem entgegen konnten jedoch keine Differenzen der Proliferationskapazitäten am Ende der Expansionsphase im Hinblick auf das Entwicklungsstadium der Embryonen festgestellt werden. Mit Hilfe der quantifizierten BrdU-Einbauraten konnte gezeigt werden, dass sich in jedem Kulturansatz durchschnittlich 30% der neuralen Progenitoren nach Abschluss der Expansionsphase noch in der mitotischen Phase des Zellzyklus befanden.

Gleichzeitig wiesen die Progenitoren aller Kulturansätze stabile Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten auf. Aufgrund der relativ hohen Laktatsekretion der Zellen kann vermutet werden, dass die Zellenergie während der Vermehrung bei 5% O₂ vorrangig aus der Glykolyse gewonnen wird. Obgleich bei diesen Reaktionen (anaerober Zustand) eine geringe ATP-Ausbeute erreicht werden kann, wurde bereits gezeigt, dass unter geringen Sauerstoffkonzentrationen (< 5% O₂) höhere Zellausbeuten an neuronalen Progenitoren erzielt werden [Studer *et al.*, 2000]. Diese Beobachtungen können dahingehend begründet werden, dass unter normalen physiologischen Bedingungen ein geringer Sauerstoffgehalt vorliegt. In einigen Gehirnregionen (Cortex, Hypothalamus, Hippocampus) wurden Konzentrationen zwischen 0,8% und 5,3% Sauerstoff gemessen [Studer *et al.*, 2000; Goda *et al.*, 1997].

4.1.2. Differenzierung

Nachdem die Analyse der Proliferationskapazität am Ende der Expansionsphase keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von dem embryonalen Entwicklungsstadium erkennen ließ, waren die Beobachtungen der Differenzierung der Progenitoren zu dopaminergen Neuronen von großem Interesse.

Während einer 7tägigen Differenzierung zeigten mikroskopische Beobachtungen, dass die Zellen flächig auf der Zellkulturmatrix aus Laminin-Fibronektin auswachsen. Dabei sind typische morphologische Strukturen, wie der Zellkörper (Perikaryon) sowie die Axone und verzweigten Dendriten neuronaler Zellen zu erkennen. Aufgrund der Ausbildung von Axonen, Dendriten und Synapsen bildet sich ein dichtes Netzwerk mit einer hohen Komplexität aus.

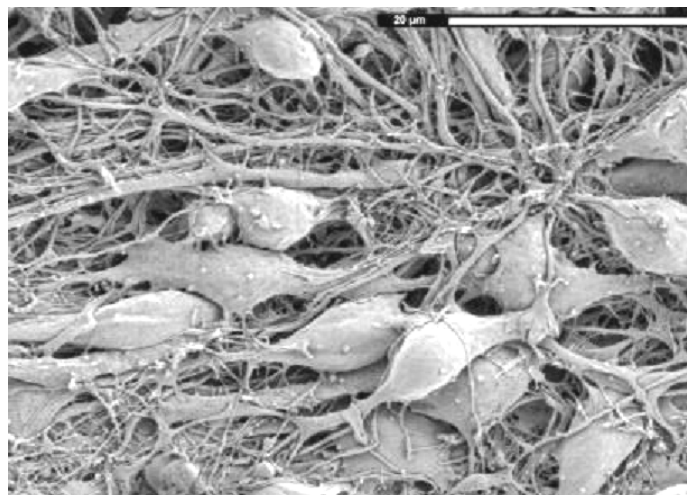


Abb. 4.1. Mikroskopische Aufnahme *in vitro* differenzierter Neurone mit einem Elektronenrastermikroskop. [Quelle: zur Verfügung gestellt von Dr. L. Just und Dr. K. Dittmar].

Neben typisch morphologischen Eigenschaften wurden auch charakteristische immunzytochemische Merkmale nachgewiesen.

Es konnten positive immunzytochemische Färbungen zellspezifischer Proteine, wie das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP2) sowie das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) gezeigt werden. Der verwendete Antikörper MAP2 umfasst dabei drei Formen des Proteins (MAP2a, MAP2b, MAP2c), welche sich im Molekulargewicht unterscheiden und zum Nachweis dendritischer Verzweigungen in neuronalem Gewebe dienen. Hingegen diente GFAP als zytoplasmatisches Intermediärfilament zum Nachweis der Astrozyten. Um einen charakteristischen Nachweis der Katecholamine zu erbringen, wurde das Markerenzym Tyrosin-Hydroxylase (TH), welches an der Synthese von Dopamin in den Neuronen beteiligt ist, immunzytochemisch mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Um den neuronalen Charakter der Zellen *in vitro* feststellen zu können, wurde zusätzlich das Zytoskelett der Neurone mit Hilfe eines Antikörpers TuJ1 gegen die β -Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli markiert.

Bei den Beobachtungen sollte zunächst geklärt werden, inwieweit das embryonale Entwicklungsstadium, aus denen die Zellen gewonnen worden sind, die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen beeinflusst. Durch die quantitative Auswertung aller immunzytochemisch markierten Kulturen ergab sich in den Kulturen aus älteren Embryonen (E12-13) gegenüber jüngeren Embryonen (E11-12) ein signifikant geringerer Anteil (> 7 fach) an TH-positiven Zellen. Dabei ist die Ursache darin zu sehen, dass Zellkulturen, welche aus dem ventralen Mesenzephalon älterer Embryonen hergestellt worden sind, eine verminderte Verfügbarkeit an potentiellen Vorläuferzellen aufweisen. Diese Aussage kann anhand verschiedener Transplantationsversuche belegt werden, welche zeigten, dass eine erfolgreiche Innervation des transplantierten Gewebes vom Alter der Embryonen abhängt, wobei embryonale Stadien (E11-12), wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, noch nicht eingesetzt wurden [Ostergaard *et al.*, 1996; Fricker *et al.*, 1997].

Der beschriebene Effekt bei jüngeren embryonalen Geweben könnte mit der *in vivo* Differenzierung der Dopaminneurone in Zusammenhang gebracht werden. Die Entwicklung des ventralen Mesenzephalons findet zwischen E11 und E15 statt, wobei die Zellteilung nach E13 weitgehend abgeschlossen ist [Lauder und Bloom, 1974]. Tyrosin-Hydroxylase konnte im Perikaryon katecholaminerger Neurone des Rattenhirns erstmals am Embryonalentwicklungstag (E) 12,5 nachgewiesen werden [Specht *et al.*, 1981]. Dies verstärkt die Aussage, dass die neuralen Progenitoren aus jüngeren Embryonen (E11-12) ein größeres Potential zur Proliferation und Differenzierung besitzen.

Neben der entwicklungsabhängigen Differenzierung neuraler Progenitoren zu TH-positiven Neuronen wurde eine zeitabhängige Differenzierung der TH-positiven Neurone (E11-12) dargestellt. Dabei war gleichzeitig von Interesse, ob die *in vitro* generierten Neurone spezifische Zielgene (TH, GFAP, NfM und Nestin) exprimieren.

Aus den ermittelten Daten geht hervor, dass die Differenzierung in den ersten 6 Tagen der Kultivierung zu TH-positiven Zellen induziert werden konnte, wobei eine fast 80fache Steigerung zwischen Tag 1 und 6 zu verzeichnen war. Jedoch wurde am 7. Tag der *in vitro* Untersuchung ein Verlust an TH-positiven Neuronen festgestellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei dopaminergen Zellen mit zunehmender Differenzierung die Empfindlichkeit gegenüber Stress ansteigt. *In vitro* Langzeituntersuchungen von Yan *et al.* ergaben einen zunehmenden Zellverlust TH-positiver Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen [Yan *et al.*, 2001]. Eine weitere Studie von Branton und Clark machte deutlich, dass bereits während der Zellisolation die Wahl des Anästhesiemittels, eine Enzymbehandlung der isolierten Mesenzephalien, auftretender Sauerstoffmangel im Mesenzephalon während der Präparation sowie eine Störung der Zell-Matrix-Bindung nach der Aussaat den Zellverlust TH-positiver Zellen verursachen können [Branton und Clark, 1999]. Neben diesen Einflüssen spielt auch die Zellvitalität nach der Passage sowie die Zelldichte (Zell-Zell-Kontakt) bei der erneuten Aussaat zur Differenzierung der neuralen Progenitoren eine bedeutende Rolle. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Aussaat eines Zellgemisches aus neuralen Zellsubtypen in höheren Zelldichten eine erhöhte Ausbeute an TH-positiven Zellen bewirkte, wobei Gliazellen einen unterstützenden Einfluss aufweisen [O'Malley *et al.*, 1991].

Neben diesen Einfluss nehmenden Faktoren werden im Zusammenhang mit der erhöhten Degeneration dopaminerg Neurone unter *in vitro* Bedingungen auch Apoptose-induzierende Prozesse diskutiert [Tepper *et al.*, 1994; Burke *et al.*, 1998]. So haben zahlreiche Untersuchungen ergeben, dass die Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) zur neuronalen Zellschädigung führen kann, wobei Sauerstoffradikale oxidative Schäden der DNA, der Lipide und der Proteinen verursachen. Gleichzeitig können ROS als Signalmoleküle agieren und somit apoptotische Reaktionskaskaden einleiten [Bredesen, 1995]. Daher könnte eine Abnahme TH-positiver Zellen nach einer 6tägigen *in vitro* Differenzierung auch auf eine Überproduktion von Sauerstoffradikalen hinweisen.

Unterstützt werden die Beobachtungen der zeitabhängigen Zelldifferenzierung, wie sie in der Literatur noch nicht aufgeführt ist, durch die RT-PCR-Analyse spezifischer Markergene. Die Expression der Tyrosin-Hydroxylase, als Marker dopaminerger Neurone ließ einen Anstieg bis zum 5. Tag der Kultivierung sowie eine anschließende Abnahme erkennen. Dadurch wurde deutlich, dass die Unterregulation des TH-Gens mit dem immunzytochemischen Nachweis korreliert, jedoch zeitlich vorgelegt ist. Ähnliche Zeitverläufe waren in dem Expressionsprofil des Neurofilaments (NFm) zu erkennen. Auch hier konnte eine ansteigende Genexpression nachgewiesen werden, welche dennoch nach einer 5tägigen Differenzierung, ähnlich wie bei der TH-Expression, abfiel. Anders verhielt sich hingegen die Expression des Markergens GFAP, einem spezifischen Marker für Astrozyten, dessen Expression nach 4tägiger Kultivierung sprunghaft zunahm. Das dargestellte Genexpressionsprofil konnte die zuvor durchgeführte immunzytochemische GFAP-Markierung innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde deutlich, dass ein sehr hoher Anteil an Astrozyten nach einer 7tägigen Kultivierung vorliegt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine Anreicherung der Kultur mit Astrozyten das Überleben dopaminerger Neurone fördert [O'Malley *et al.*, 1992]. Auch konnten die Studien von Bronstein *et al.* zeigen, dass Gliazellen die Neurone gegenüber toxischen Einflüssen schützen können [Bronstein *et al.*, 1995].

Die Expressionsanalyse des Intermediärfilaments Nestin gibt hingegen Aufschluss über den Anteil an undifferenzierten Zellen und ist ein Marker für Vorläuferzellen [Studer *et al.*, 2000]. In der vorliegenden Arbeit konnte, wie zu erwarten war, ein Rückgang der Nestin-Expression nach einer 4tägigen Differenzierung dargestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass ab diesem Zeitpunkt die Zellen überwiegend zu spezifischen Zellsubtypen ausdifferenziert waren. Am ersten Tag der Differenzierung wurde eine sehr schwache Nestin-Expression beobachtet, was möglicherweise auf die Kulturbehandlung zurückzuführen ist. Da die Zellen zuvor mechanisch dissoziiert wurden, könnte es sein, dass die Expression aufgrund der Reorganisation des Zytoskeletts herunterreguliert oder sogar inhibiert wurde.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Differenzierung neuraler Progenitoren eine Korrelation zwischen den immunzytochemischen und den molekulargenetischen Daten. Gleichzeitig wird deutlich, wie sensitiv die Zellen auf die Kulturbedingungen reagieren können und wie groß der Einfluss des embryonalen Entwicklungsstadiums auf die Ausbeute dopaminerger Neurone ist.

4.2. *In vitro* Differenzierung neuraler Progenitoren unter dem Einfluss von Sauerstoff

Oxidativer Stress wurde in zahlreichen Veröffentlichungen als mögliche Ursache der selektiven Degeneration dopaminergener Neurone bei Morbus Parkinson beschrieben [Fahn und Cohn, 1992; Lièvre *et al.*, 2000; Halliwell, 1992]. Obgleich die Anwesenheit von Sauerstoff für den Organismus notwendig ist, um Redox-Reaktionen durchführen zu können, kann er in zu hohen (Hyperoxie) aber auch zu niedrigen (Hypoxie) Konzentrationen auf die Zellen schädigend wirken. Grund dafür ist die molekulare Form von Sauerstoff, welcher zwei ungepaarte Elektronen aufweist und somit als Diradikal auftritt [Davies, 1995]. Die Sauerstoff-Toxizität im ZNS gehört zu den am besten verstandenen Mechanismen bei neurologischen Funktionsstörungen [Dean *et al.*, 2003].

Die meisten *in vitro* Zellsysteme werden derzeit bei einer Konzentration von 21% Luftsauerstoff kultiviert. Es ist jedoch zu beachten, dass sowohl im menschlichen als auch im tierischen Organismus lediglich in den Linsenzellen des Auges und den Zellen des oberen Lungenbereiches so hohe Sauerstoffkonzentrationen vorliegen [Davies, 2000b]. Die meisten tierischen Zellen existieren *in vivo* unter Sauerstoffkonzentration von 4% oder weniger. Davies wies darauf hin, dass Zellen, welche bei 3% O₂ kultiviert werden, zwar sensibler gegenüber oxidativen Vorgängen sein können, jedoch weitaus geringere oxidative Schädigungen aufweisen [Davies, 2000b]. Aufgrund dessen kann postuliert werden, dass primäre *Monolayer*-Kulturen, welche bei 21% O₂ inkubiert werden, bereits einem oxidativen Stress ausgesetzt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde der oxidative Stress neben unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen durch den Einsatz des bioFolie-Membransystems verstärkt. Die Zellen wurden auf diese Weise, unabhängig von der Sauerstoffversorgung über das Kulturmedium, zusätzlich durch die Sauerstoffdiffusion über die bioFolie-Membran beeinflusst.

4.2.1. Analyse des Energiestoffwechsels unter dem Einfluss von Sauerstoff

Da Glukose ein wichtiger Energielieferant des Gehirns ist, wurde der Glukosestoffwechsel während der Kultivierung unter dem Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit analysiert. Dabei dienten neurale Zelllinien als Modellsystem, um zunächst die Eignung des verwendeten bioFolie-Membransystems zu prüfen. Anschließend wurden die primären Kulturen neuraler Progenitoren unter vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität untersucht.

Zunächst sollen die Ergebnisse des Energiestoffwechsels der **Zelllinien (GOS-3- und PC-12-Zellen)**, welche als neurale Zellmodelle dienen, diskutiert werden.

Von beiden Zelllinien ist bekannt, dass sie an eine Kultivierungsumgebung bei 21% O₂ adaptiert sind und somit unter hoher Sauerstoffverfügbarkeit ein besseres Zellwachstum aufweisen. Dies konnte durch die ermittelte Wachstumskurve der humanen Astrozytoma/Oligodendroglioma- (GOS-3) Zelllinie deutlich gemacht werden, welche die höchste Zelldichte nach einer 13tägigen Kultivierung bei 21% O₂ erreichte. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass die Kontrollansätze (bioFolie in Multiwellplatten) sich nicht von den Kulturansätzen in Multiwellplatten unterscheiden. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die bioFolie selbst keinen Einfluss auf das Zellsystem ausübt. Wenn auch nicht signifikant, so konnte auch durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl nach einer 4tägigen Kultivierung der PC-12- und GOS-3-Zellen nachgewiesen werden, dass Sauerstoffmangel (Hypoxie) zu einer leichten Verringerung der Zelldichte führt und somit auf eine geringere Zellvitalität hindeutet [Gross *et al.*, 2000].

Alle Kulturansätze zur Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffkonzentration wurden mit einer hohen Zelldichte hergestellt, um den Einfluss auf die Stoffwechselaktivität während der Zelldifferenzierung nicht jedoch auf die Zellteilung zu beobachten.

Die PC-12-Zellen sowie GOS-3-Zellen zeigten eine deutliche Anhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration sowohl in Multiwellplatten als auch im bioFolie-Membransystem. Setzt man voraus, dass der Energiebedarf einer jeden Zelle gleich ist, so kann man aufgrund der geringeren Glukoseverbrauchsrate mit steigender Sauerstoffkonzentration darauf schließen, dass es zu einer höheren substratbezogenen Energieausbeute in beiden Zellsystemen kommt. Dabei können die Zellen durch eine vollständige Oxidation der Glukose zu CO₂ und Wasser bis zu 36 Mol ATP gewinnen. Unter sauerstoffarmen (anaeroben) Bedingungen liefert die Glykolyse durch den Glukoseabbau (1 Mol Glukose zu 2 Mol Laktat) lediglich eine Energieausbeute von 2 ATP [Berg *et al.*, 2003]. Dies führt wiederum zu einer hohen Glukoseverbrauchsrate, um den Energiebedarf der Zelle zu decken.

Vergleicht man die Kulturen in Multiwellplatten mit denen im bioFolie-Membransystem, so wird der positive Effekt der medienunabhängigen Sauerstoffversorgung über die bioFolie-Membran auf die Zelllinien deutlich. Unter geringen Sauerstoffkonzentrationen (2%-5%) sind die Glukoseverbrauchsrate aller Kulturen im bioFolie-Membransystem geringer, als im Multiwellsystem. Hingegen konnte ein Unterschied bei hohen Sauerstoffkonzentrationen nicht dargestellt werden, was mit einer Sauerstoffsättigung der Kulturen in Multiwellplatten bei 21% O₂ begründet werden könnte.

Im nachfolgenden Abschnitt sollen nun die Beobachtungen des **primären neuronalen Zellsystems** im Mittelpunkt der Diskussion stehen.

Während der Differenzierung neuraler embryonaler Progenitoren des ventralen Mesenzephalons ergaben sich Glukoseverbrauchsraten, welche unabhängig von der Kultivierungszeit, Zellkulturmatrix, Sauerstoffkonzentration oder dem Zusatz von Ascorbinsäure (Antioxidantium) gleich bleibend bei durchschnittlich $22 \mu\text{mol/h}/10^5$ Zellen lagen. Dadurch ergaben sich bis zu 8fach höhere Substratverbrauchsraten in primären Zellkulturen verglichen mit dem neuronalen Zellmodell der PC-12-Kulturen. Diese Beobachtungen könnten damit begründet werden, dass die neuronale Aktivität primärer Zellen höher ist, als die der PC-12-Zelllinie. Um das Membranpotential nach einer Depolarisation in neuronalen Zellen wiederherzustellen, steigt die benötigte Energiemenge in Form von ATP deutlich an. Dabei dient der Glukoseverbrauch in neuronalen sowie in glialen Zellen nicht nur der Energiegewinnung, sondern auch dem Aufbau von Zellbestandteilen wie Lipiden und der Produktion von Aminosäuren [Waki *et al.*, 2001; Koolman und Röhm, 1998].

Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen dem Glukoseverbrauch und der Laktatproduktion dargestellt werden, wobei die Raten nach einer 7tägigen Differenzierung der neuronalen Progenitoren mit steigendem Sauerstoffgehalt abnahmen. Dabei wurde durch die steigende Sauerstoffkonzentration von 5% auf 21% in Kulturen beider Zellkultursysteme (Multiwellplatten sowie bioFolie-Membransystem) die Laktatproduktion um mehr als 50% gesenkt.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch in Kulturen neuraler Progenitoren der Substratumsatz mit dem Sauerstoffverbrauch durch den Trikarbonsäurezyklus und somit einer effizienten Energieproduktion gekoppelt ist. Jedoch ist auch zu beachten, dass Astrozyten, welche vorrangig einen glykolytischen Stoffwechsel betreiben, große Mengen an Laktat bilden können, auch in Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff (aeroben Bedingungen) [Deitmer, 2001; Dringen *et al.*, 1993a]. So sind die ermittelten Laktatbildungsraten als relativ gering zu betrachten. Laktat, welches in den Astrozyten gebildet wird, stellt im neuronalen System neben Glukose wiederum eine weitere Hauptenergiequelle dar [Dringen *et al.*, 1993a und b]. Neurone sind aufgrund der vorhandenen Laktatdehydrogenase (LDH Isoform 1) in der Lage Laktat zu Pyruvat umzuwandeln, welches dem Trikarbonsäurezyklus zugeführt werden kann [Bittar *et al.*, 1996; Deitmer, 2001]. Es wurde bereits von Schnurr *et al.* gezeigt, dass selbst bei pathologischem Glukosemangel die synaptischen Aktivitäten und die neuronalen Funktionen durch das Vorhandensein von Laktat und Sauerstoff aufrechterhalten werden können [Schurr *et al.*, 1988].

Die Erkenntnisse der hier durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass sowohl die GOS-3-Zellen und PC-12-Zellen, als auch die neuronalen Progenitoren die notwendige Zellenergie bei geringer Sauerstoffverfügbarkeit hauptsächlich aus dem glykolytischen Stoffwechsel beziehen. So wird durch eine Senkung der Sauerstoffverfügbarkeit von 21% O₂ im bioFolie-Membransystem auf 5% O₂ in Multiwellplatten ein Anstieg der Laktatbildungsrate von 80% in PC-12-Zellkulturen und 64% in primären Zellkulturen verursacht. Zelllinien scheinen auf den induzierten Sauerstoffmangel sensitiver zu reagieren, als neurale Progenitoren. Diese Beobachtung kann dadurch unterstützt werden, dass die Kultivierung primärer Zellen bei einer geringeren Sauerstoffkonzentration den natürlichen, physiologischen Bedingungen des ZNS näher kommt, während die Zelllinien an hohe Sauerstoffkonzentration angepasst sind [Studer *et al.*, 2000; Davies, 2000a].

4.2.2. Analyse der TH-Genexpression sowie der Dopaminsekretion unter dem Einfluss von Sauerstoff

Um deutlich zu machen, welche Auswirkungen die Sauerstoffkonzentration auf die Genexpression der Tyrosin-Hydroxylase hat, wurden sowohl PC-12-Zellen als auch neurale embryonale Progenitorzellen unter verschiedenen Sauerstoffverfügbarkeiten kultiviert.

Die sensitiven Expressionsanalysen mittels quantitativer *Real Time* PCR am neuronalen Zellmodell (**PC-12-Zelllinie**) ergaben nach einer 4tägigen Kultivierungsdauer eine Unterregulation des TH-Gens mit zunehmender Sauerstoffkonzentration. Dabei konnte auch festgestellt werden, dass die ermittelten Konzentrationen des exprimierten TH-Gens in Kulturen im bioFolie-Membransystem geringer waren als in Kulturen in Multiwellplatten. Die Erkenntnisse waren vergleichbar mit denen der *in vitro* Studien von Gross *et al.* und Millhorn *et al.*, welche mittels RT-PCR-Untersuchungen eine durch Hypoxie (Sauerstoffmangel) induzierte Zunahme des TH-mRNA-Gehaltes in PC-12-Zellen zeigten [Gross *et al.*, 2000; Millhorn *et al.*, 1997].

In Zusammenhang mit der erhöhten Genexpression der Tyrosin-Hydroxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Dopaminsynthese, konnten vergleichende Dopaminkonzentrationen im Medienüberstand mit Hilfe der HPLC detektiert werden.

Die gemessenen Konzentrationen in den PC-12-Zellkulturen korrelierten mit dem zuvor beschriebenen Genexpressionsprofil, wobei sich eine stufenweise Zunahme der Dopaminsekretion mit abnehmender Sauerstoffverfügbarkeit abzeichnete. Die höchsten Konzentrationen wurden in den Medienextrakten der Kulturen nachgewiesen, welche unter größtem Sauerstoffmangel (bei 2% O₂ in Multiwellplatten) inkubiert worden sind.

Vergleichende Aussagen konnten auch durch die Versuche von Kuo *et al.*, Kumar *et al.* und Gross *et al.* gemacht werden, welche zudem eine sauerstoffabhängige Dopaminsekretion nachwiesen [Kumar *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000]. Dabei nahm die Dopaminkonzentration zwischen einem Sauerstoffgehalt von 4% bis 9% deutlich zu. Mit Annäherung an normale Sauerstoffbedingungen (Normoxia; 21% O₂) sank die Dopaminsekretion der PC-12-Zellen ab. Dabei ist auffällig, dass der Hypoxie-Bereich in der Kultur (pO₂ 25-40 mmHg = 2-5% O₂), welcher zu einer verstärkten Dopaminsekretion führt, mit den physiologischen und pathologischen Bedingungen vergleichbar ist [Kumar *et al.*, 1998].

Bei den Beobachtungen der abnehmenden Dopaminkonzentrationen mit Zunahme des Sauerstoffgehaltes kann aber auch die Autoxidation dieses Neurotransmitters in Betracht gezogen werden, welche in Anwesenheit von Sauerstoff spontan auftritt. Eine Abnahme der Dopaminkonzentration im Kulturmedium von etwa 47% kann bereits nach einer 24stündigen Inkubation nachgewiesen werden [Pedrosa und Soares-da-Silva, 2002].

In den Zellkulturen der **neuralen Progenitoren**, welche in bioFolie-Membransystemen bei 5% O₂ und 21% O₂ kultiviert worden sind, konnte mit Hilfe der Genexpressionsanalyse ebenfalls eine Unterregulation des TH-Gens (4fach) bei hoher Sauerstoffverfügbarkeit nachgewiesen werden. Die Daten korrelieren dabei mit denen der Untersuchungen von Studer *et al.*, der bei embryonalen neuralen Progenitoren (E12; in Multiwellplatten) mittels Western-Blot- sowie RT-PCR-Analyse eine höhere TH-Expression bei geringerer Sauerstoffkonzentration ($3 \pm 2\%$ O₂) detektierte [Studer *et al.*, 2000]. Gleichzeitig wiesen diese Studien von Studer *et al.* darauf hin, dass geringere Sauerstoffkonzentrationen einen größeren Einfluss auf die Generierung dopaminerger Neurone während der Expansionsphase und somit auf einen noch unbekannten Mechanismus vor der neuronalen Differenzierung ausüben.

Bei den zusätzlichen Bestimmungen der Dopaminsekretion neuraler Progenitoren in den gleichen Kulturansätzen konnten auch hier die von Studer *et al.* ermittelten Daten in vergleichbaren Kulturen hinzugezogen werden. Diese Studien haben gezeigt, dass die Senkung der Sauerstoffkonzentration zu einer 5fach höheren Dopaminsekretion im Kulturmedium führte [Studer *et al.*, 2000]. Der von Studer *et al.* beobachtete Effekt konnte auch durch die Verwendung des bioFolie-Membransystems bestätigt werden und korreliert mit den ermittelten Genexpressionsanalysen. Jedoch wurde lediglich eine 2,5fache Erhöhung der Dopaminkonzentration bei 5% O₂ versus 21% O₂ gemessen, was mit den erhöhten oxidativen Kulturbedingungen durch den Einsatz des bioFolie-Membransystems in Zusammenhang gebracht werden kann.

Die hohe TH-Expression und Dopaminsekretion bei geringem Sauerstoffgehalt hängt möglicherweise mit dem physiologischen Sauerstoffoptimum der primären neuronalen Progenitoren zusammen.

Um den **zeitabhängigen Verlauf der Differenzierung** detailliert charakterisieren zu können, wurde ergänzend zur immunzytochemischen Detektion der Dopaminneurone sowie der TH-Genexpressionsanalyse auch die Dopaminsekretion in primären Zellkulturen im bioFolie-Membransystem bestimmt. Dabei korrelierten die Ergebnisse miteinander. Nach einem Anstieg der Dopaminsekretion sowie der Genexpression bis zum 4. Tag der Differenzierung bei 5% O₂ folgt eine kontinuierliche Abnahme der ermittelten Parameter. Hingegen konnten in den Kulturmedienüberständen bei einer erhöhten Sauerstoffkonzentration (21% O₂) vergleichsweise geringe Dopaminsekretionen detektiert werden, welche dennoch eine Abnahme nach 5tägiger Kultivierung aufwiesen. Die Gründe können darin zu finden sein, dass die Sensitivität der Kulturen mit der Kultivierungsdauer und der Sauerstoffverfügbarkeit zunimmt. Zum anderen führt ein höherer Sauerstoffgehalt zusätzlich zur Inhibierung der TH-Expression auch zu einer zunehmenden Dopamin-Autoxidation.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die erhöhten Sauerstoffkonzentrationen in beiden Zellsystemen (PC-12-Zellen und primäre neurale Progenitoren) eine Abnahme der TH-Expression in Korrelation mit der Dopaminsekretion nachgewiesen werden konnte. Jedoch bewirkt ein Überangebot an Sauerstoff und ein folglich erhöhter oxidativer Stress in primären neuronalen Progenitorzellen eine signifikante Unterregulation der TH-Expression sowie der Dopaminsekretion, da physiologisch-ähnliche Bedingungen erst bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen (> 5%) geschaffen werden können. So hat eine geringere Sauerstoffverfügbarkeit einen positiven Effekt auf die Differenzierung embryonaler neuraler Progenitoren zu dopaminergen Neuronen.

4.2.3. Analyse apoptotischer neuraler Zellen unter dem Einfluss von Sauerstoff

Die weitere zu klärende Fragestellung war der Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen (oxidativen Stresses) auf das Überleben der Zelle. Um den Nachweis zu erbringen, wurden die DNA-Strangbrüche apoptotischer Zellen immunzytochemisch nach dem Prinzip des TUNEL-Tests markiert.

Verschiedenste Literaturquellen beschreiben, dass die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) während des Stoffwechsels neuronaler Zellen eine bedeutende Rolle im Apoptosemechanismus spielt [Halliwell, 1989; Jenner 1998 und 2003; Ratan *et al.*, 1994; Colton *et al.*, 1995; De La Cruz *et al.*, 1996a; Wei *et al.*, 2000; Studer *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2002]. Wei *et al.* beobachtete die kinetische Generierung von ROS in primären neuronalen Zellkulturen und im Speziellen die Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO[•]), wodurch oxidativer Stress und folglich der apoptotische Zelltod induziert wird [Wei *et al.*, 2000]. Die *in vivo* Studien von De La Cruz *et al.* zeigten zuvor die Inhibierung der Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Aktivität durch die Stimulierung der Produktion freier Radikale [De La Cruz *et al.*, 1996b]. Durch die Experimente von Studer *et al.* wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf embryonale neurale Progenitoren des ventralen Mesenzephalons (E12) deutlich dargestellt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Zunahme apoptotischer (TUNEL-positiver) Zellen in Kulturen bei 21% O₂ versus 3% O₂ [Studer *et al.*, 2000]. Aber auch die Dopamin-Autoxidation, welche unter anderem die Produktion von H₂O₂ verursacht, wurde bereits als Ursache des programmierten, neuronalen Zelltodes identifiziert [Jenner und Olanow, 1996; Pedrosa und Soares-da-Silva, 2002].

Zum Nachweis, ob das entwickelte bioFolie-Membransystem als Kultur-Modell verwendet werden kann, um oxidativen Stress zu induzieren, wurden die Analysen an der PC-12-Zelllinie durchgeführt.

Die Untersuchungen ergaben einen signifikant höheren Anteil TUNEL-positiver Zellen bei minimaler Sauerstoffverfügbarkeit (in Multiwellplatten bei 2% O₂). Die Ursache ist einerseits in der erhöhten Laktatkonzentration und dem limitierten Energiestoffwechsel (ATP-Gewinn) bei abnehmender Sauerstoffkonzentration zu sehen.

Andererseits wurden unter gleichen Bedingungen die höchsten Dopaminkonzentrationen im Medium detektiert, was ein Hinweis auf einen neurotoxischen Effekt durch eine verstärkte Dopamin-Autoxidation sein könnte [Kuo *et al.*, 2000]. Bereits während der Synthese kann die Tyrosin-Hydroxylase durch einen Elektronentransfer in die radikalische Form übergehen und in Anwesenheit von Sauerstoff Superoxidradikale bilden [Adams *et al.*, 1997]. Außerdem wird ein Grossteil des in den neuronalen Zellen synthetisierten Dopamins durch das Enzym Monoaminoxidase-B (MAO-B) abgebaut, wodurch pro Molekül Dopamin ein Molekül Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entsteht. Untersuchungen an PC-12-Zellkulturen, auf die durch Kaliumcyanid eine chemisch induzierte Hypoxie wirkte, zeigten vergleichbare Ergebnisse. Durch die ansteigende Dopaminsekretion wurden neuronale Zellschädigungen (DNA-Fragmentierung) verursacht, welche auf eine verstärkte autoxidative ROS-Bildung hinweisen [Kuo *et al.*, 2000].

Dieser Dopamin-induzierte Zelltod konnte auch in anderen catecholaminergen Zelllinien nachgewiesen werden [Masserano *et al.*, 2000].

Eine Erhöhung der Apoptoserate konnte ebenfalls bei der höchsten Sauerstoffverfügbarkeit, in Kulturen im bioFolie-Membransystem bei 21% O₂, beobachtet werden. Während in diesem Ansatz der geringste Dopamingehalt detektiert wurde, erhöhte sich der apoptotische Zellanteil um mehr als 50% gegenüber den Kulturen in Multiwellplatten. Die Beobachtung kann auf einen Hyperoxie-Effekt zurückgeführt werden. Aufgrund der direkten Sauerstoffdiffusion durch die bioFolie-Membran zur Zellkultur kommt es zu einem Überangebot an Sauerstoff, welcher als direkte Quelle freier Radikale (O₂[•]) vorliegt [Jones, 1985]. Da der antioxidative Mechanismus der Zellen die exzessive Überproduktion an ROS nicht abfangen kann, wird ein toxischer Effekt ausgelöst.

Aufgrund dessen kann die Aussage getroffen werden, dass das entwickelte bioFolie-Membransystem erstmals als *in vitro* Kultur-Modell für die Induktion von oxidativem Stress und für Untersuchungen apoptotischer Mechanismen in neuronalen Zellsystemen eingesetzt werden kann.

4.2.4. *In vitro* Differenzierung dopaminergener Neurone unter dem Einfluss von Sauerstoff und Ascorbinsäure

Durch immunzytochemische Markierungen sollte gezeigt werden, wie sich der Einfluss der variierenden Sauerstoffverfügbarkeit in der Differenzierung zu Neuronen (TuJ1-positive Zellen) und dopaminergen Neuronen (TH- und TuJ1-positive Zellen) auch auf Proteinebene widerspiegelt.

Die Untersuchungen an primären Kulturen ohne Zusatz von Antioxidantien ergaben, dass bei geringster Sauerstoffverfügbarkeit (bei 5% O₂ in Multiwellplatten) die höchste Anzahl an dopaminergen Neuronen nachweisbar war. Hingegen wiesen alle Kulturen im bioFolie-Membransystem sowie im Plastik-Well bei 21% O₂ fast 50% weniger TH-positive Neurone auf, was auch durch Studer *et al.* beschrieben worden ist [Studer *et al.*, 2000]. Bereits Colton *et al.* bewies in seinen Experimenten, dass eine Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes auf 38 Torr (= 5% O₂) ähnliche physiologische Bedingungen wie im Gehirn simuliert und somit ein geringerer oxidativer Stress in den Zellen induziert wird. Als Folge konnte eine höhere Ausbeute an TH-positiven Neuronen in der Kultur erzielt werden [Colton *et al.*, 1995]. Außerdem war in allen Kulturansätzen durch mikroskopische Beobachtungen zu erkennen, dass in Kulturen unter hohem Sauerstoffeinfluss ein Verlust der neuronalen Ausläufer (Dendriten) auftrat. Vergleichbare Erkenntnisse ergaben die Untersuchungen von Bywood und Johnson, welche den

dendritischen Verlust als charakteristischen, frühen Indikator für die Degeneration katecholaminerger Neurone beschrieben [Bywood und Johnson, 2000].

Um die Aussage zu bestätigen, dass die Zelldifferenzierung neuraler Progenitoren tatsächlich durch den Einfluss des oxidativen Stresses beeinflusst wird, wurde der Effekt der Ascorbinsäure als Antioxidantium beobachtet. Es sind eine Vielzahl von physiologischen Effekten der Ascorbinsäure beschrieben worden [Padh, 1990]. Dabei ist der antioxidative Mechanismus hervorzuheben, bei dem durch die Abgabe von Elektronen, hochreaktive freie Radikale zu schwach reaktiven Ascorbyl-Radikalen reduziert werden [Halliwell, 1996]. Verschiedenste Untersuchungen deuten darauf hin, dass Ascorbinsäure (Vitamin C) aber nicht nur als Antioxidantium, sondern auch als Aktivator der Tyrosin-Hydroxylase einen stimulierenden Effekt auf die Differenzierung der Progenitoren zu TH-positiven Zellen besitzt [Yan *et al.*, 2001; Halliwell, 1996; Nakashima *et al.*, 1970]. So zeigte Nakashima *et al.* bereits 1970 anhand von *in vitro* Experimenten an Schweinezellkulturen, dass die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase durch die Supplementierung von Ascorbinsäure signifikant erhöht wird. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass das Gehirn hohe Mengen an Ascorbinsäure enthält, wobei der Gehalt im embryonalen Gehirn höher ist als im adulten Gehirn.

In den hier durchgeführten Experimenten führte die Verstärkung des antioxidativen Mechanismus der Zellen mittels Ascorbinsäure bei gleichzeitiger Senkung des Sauerstoffpartialdrucks ($38 \text{ Torr} = 5\% \text{ O}_2$) zu einer Erhöhung der Anzahl TH-positiver Neurone um bis zu 80%. Zusätzlich wurde die Konzentrationsabhängigkeit detaillierter und in Zusammenhang mit den verstärkten oxidativen Bedingungen aufgrund der bioFolie-Membran dargestellt. Dabei wiesen die Differenzierungen neuronaler Zellen (TuJ1-positive Zellen) geringe Unterschiede in Abhängigkeit von der Ascorbinsäurekonzentration sowie dem Sauerstoffgehalt auf. Geringe Abweichungen sind im Zusammenhang mit der Kulturherstellung zu betrachten, wobei leichte Varianzen der Zelldichte oder Zellzusammensetzung einen Einfluss auf die Differenzierung zu spezifischen Zellsubtypen haben können.

Eine sehr deutliche antioxidative Abhängigkeit ist jedoch in der Differenzierung zu dopaminergen Neuronen (TH-positiven Zellen) zu erkennen. Bei geringer Sauerstoffkonzentration stieg die Ausbeute an Dopaminneuronen mit zunehmender Ascorbinsäurekonzentration (50 bis $300 \mu\text{M}$) an. Dieses Ergebnis kann nicht nur auf einen geringeren oxidativen Einfluss, sondern auch auf die antioxidative und aktivierende Wirkung der Ascorbinsäure zurückgeführt werden. Dennoch kann gezeigt werden, dass der erhöhte oxidative Stress im bioFolie-Membransystem, aufgrund der direkten Sauerstoffdiffusion durch die bioFolie-Membran, unabhängig von der Ascorbinsäurekonzentration zu einer Limitierung der TH-Expression führt.

Deutlicher wird dieses Phänomen bei der Betrachtung der Kulturen bei 21% O₂. Der oxidative Einfluss auf die dopaminergen Neurone in Multiwellplatten konnte geringfügig durch die Supplementierung der Ascorbinsäure begrenzt werden. Dabei lag die durchschnittliche Erhöhung der Zellzahl TH-positiver Neurone (versus Kontrolle) unabhängig von der Ascorbinsäurekonzentration bei 65%. Im Gegensatz dazu war der oxidative Einfluss bei höchster Sauerstoffverfügbarkeit (bei 21% O₂ im bioFolie-Membransystem) zu stark. Hier konnte die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr nachgewiesen werden. Die exzessive Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies konnte durch die verfügbare Konzentration des Antioxidatiums nicht mehr abgefangen werden.

Zusammenfassend konnte anhand der Ergebnisse gezeigt werden, dass unter Verwendung des entwickelten bioFolie-Membransystems sowohl das neuronale Zellmodell (PC-12-Zelllinie) als auch primäre neurale Progenitoren beeinflusst werden. Aus der erhöhten Sauerstoffverfügbarkeit resultierte die Abnahme der TH-Genexpression sowie der Dopaminsekretion in beiden Zellsystemen. Dabei reagierten die primären Zellen sensibler auf erhöhte Sauerstoffkonzentrationen. Dies ist damit zu begründen, dass die Kulturbedingungen primärer Zellen bei einer geringeren Sauerstoffkonzentration den natürlichen physiologischen Bedingungen des ZNS näher kommen. In den primären neuronalen Zellkulturen konnte der Einfluss des erhöhten oxidativen Stresses auch sehr deutlich durch die Abnahme der sich entwickelnden dopaminergen Neurone dargestellt werden. Bei einem hohen Sauerstoffeinfluss im bioFolie-Membransystem wurde die Differenzierung der neuronalen Progenitoren zu TH-positiven Neuronen erheblich inhibiert, was auch durch den Zusatz von Ascorbinsäure nicht kompensiert werden konnte.

Die proteomischen und genomischen Charakterisierungen der PC-12-Zellen ergaben weniger Differenzen hinsichtlich der sauerstoffabhängigen Effekte, als im primären Zellsystem, da die immortalisierte Zelllinie an hohe Sauerstoffkonzentrationen adaptiert ist. Dennoch konnte in den PC-12-Zellkulturen ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen bei 21% im bioFolie-Membransystem nachgewiesen werden, was auf eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies zurückgeführt werden kann.

Somit zeigen die Ergebnisse, dass das etablierte bioFolie-Membransystem geeignet ist, um den Einfluss erhöhter oxidativer Bedingungen bzw. der ROS-Bildung in neuronalen Zellkulturen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Proliferation und Differenzierung neuraler Progenitoren des ventralen Mesenzephalons embryonaler Ratten in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen untersucht. Dabei war zum einen das Entwicklungsstadium der Embryonen, aus dem die Zellen isoliert wurden von Interesse. Zum anderen stand der Einfluss von Sauerstoff auf die Stoffwechselaktivitäten und Vitalität neuraler Zellen im Mittelpunkt der Untersuchungen, wobei ein neu entwickeltes bioFolie-Membransystem verwendet worden ist.

Die Erkenntnisse in diesem Forschungsbereich sind von großem Interesse, da sie Aufschluss über neurodegenerative Mechanismen geben, welche bei der Parkinsonschen Erkrankung eine bedeutende Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Experimente an isolierten primären neuralen Progenitoren zeigten, dass neben den Isolations- und Kulturbedingungen (z.B. Zusatz von Wachstumsfaktoren und Mediensupplementen) auch das Entwicklungsstadium der Spender-Embryonen von Bedeutung ist. Dabei wurde sowohl die Proliferationskapazität als auch das Differenzierungspotential der Progenitoren mit Hilfe von Genexpressionsanalysen, immunzytochemischen Markierungen sowie der HPLC-Technik charakterisiert.

Durch die Verwendung früher Entwicklungsstadien (E11-12) konnte trotz geringer Ausgangszellzahlen eine deutlich höhere Zellzahlausbeute nach der Expansionsphase, und eine stark signifikant höhere Anzahl dopaminerger Neurone nach der anschließenden Differenzierung erreicht werden. Bezug nehmend auf die Zellzahlbestimmungen wurde eine 1,4fach höhere Zellausbeute durch die Kultivierung der Progenitoren aus früheren Stadien nachgewiesen. Des Weiteren ergab die Quantifizierung der Kulturen einen 37%igen Anteil an TH-positiven Zellen nach einer 7tägigen Differenzierung. Die Studien zeigen, dass die frühen embryonalen Entwicklungsstadien ein höheres Proliferations- und Differenzierungspotential zu Dopaminneuronen aufweisen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des Sauerstoffs auf das neurale Zellsystem im Detail untersucht. Dabei wurde das entwickelte bioFolie-Membransystem erstmals auf seine Eignung als *in vitro*-Modell für die Induktion von oxidativem Stress hin untersucht.

Initiale Untersuchungen neuraler immortalisierter Zelllinien (GOS-3- und PC-12-Zelllinien) wiesen aufgrund der erhöhten Glukoseverbrauchsrate sowie stark ansteigender Laktatbildungsraten unter Sauerstoffmangel auf einen verstärkt glykolytischen Stoffwechsel der Zellen hin. Zusätzlich ergaben sich eine Überregulation der TH-Genexpression und Dopaminsekretion sowie ein Anstieg der Apoptoserate bei geringen Sauerstoffkonzentrationen in PC-12-Zellkulturen. Die erhöhte Rate apoptotischer Zellen kann zum einen mit dem anaeroben Stoffwechsel (Anstieg der Laktatproduktion; geringere ATP-Ausbeute) und zum anderen mit der hohen Dopaminsekretion und damit verbundenen autoxidativen Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) im Zusammenhang stehen.

Eine erhöhte Apoptoserate konnte auch in den Kulturen katecholaminerger PC-12-Zellen bei einem Sauerstoffgehalt von 21% im bioFolie-Membransystem festgestellt werden, welche im Vergleich zu herkömmlichen Multiwellplatten um mehr als 50% anstieg. Die Ursache dieser Beobachtung ist in einer erhöhten Sauerstoffverfügbarkeit zu sehen, die zu einer gesteigerten Produktion freier Sauerstoffradikale führt.

Die Studien am primären neuronalen Zellsystem resultierten gegenüber den immortalisierten Zelllinien in einer signifikanten Beeinflussung des Differenzierungspotentials der Zellen. Während die Glukoseverbrauchsrate der embryonalen Progenitoren durch die variierende Sauerstoffverfügbarkeit nicht verändert wurden, konnte die TH-Expression, Dopaminsekretion und die Differenzierung zu TH-positiven Zellen bei geringem Sauerstoffgehalt deutlich erhöht werden. Diesbezüglich ist zu betonen, dass ein Sauerstoffgehalt von etwa 5% den physiologischen Bedingungen des Gehirns entspricht. Bei hohen Sauerstoffpartialdrücken, vor allem unter Anwendung des bioFolie-Membransystems, zeigte sich ein inhibierender Effekt auf die Differenzierung zu dopaminergen Neuronen. Dem oxidativen Einfluss auf die Differenzierung neuraler Progenitoren konnte bei einer geringen Sauerstoffverfügbarkeit durch die Supplementierung von Ascorbinsäure teilweise entgegengewirkt werden. Dies spiegelte sich in einer deutlich höheren Ausbeute dopaminergener Neurone (um mehr als 50%) im Vergleich zu Kulturen ohne Antioxidantium-Supplementierung wider.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das bioFolie-Membransystem erstmals als *in vitro*-Modell für die Kultivierung neuronaler Zellsysteme erfolgreich eingesetzt werden konnte. Zusätzlich wurde ein Zellkulturmodell geschaffen, das es erlaubt, den Einfluss des oxidativen Stresses bei neurodegenerativen Prozessen ohne Zusatz von Neurotoxinen oder Hypoxie-induzierenden Chemikalien im Zellkultursystem zu analysieren.

6 Literaturverzeichnis

- [Aarsland *et al.*, 1999] Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, Janvin C, Karlsen K, Tandberg E, Cummings JL. 1999. Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 67(4), 492-6
- [Abrous *et al.*, 1993] Abrous DN, Torres EM, Dunnett SB. 1993. Dopaminergic grafts implanted into the neonatal or adult striatum: comparative effects on rotation and paw reaching deficits induced by subsequent unilateral nigrostriatal lesions in adulthood. *Neuroscience*. 54(3), 657-68
- [Adams *et al.*, 1997] Adams JD Jr, Klaidman LK, Ribeiro P. 1997. Tyrosine hydroxylase: mechanisms of oxygen radical formation. *Redox Rep*. 3, 273-279
- [Arenas, 2002] Arenas E. 2002. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*. 57(6), 795-808
- [Arends *et al.*, 1990] Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*. 136(3), 593-608
- [Bader, 2002] Bader A. 2002. Verfahren und Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen. Patent: DE0010046175 A1
- [Barzilai *et al.*, 2003a] Barzilai A, Daily D, Zilkha-Falb R, Ziv I, Offen D, Melamed E, Shirvan A. 2003a. The molecular mechanisms of dopamine toxicity. *Adv Neurol*. 91, 73-82
- [Barzilai *et al.*, 2003b] Barzilai A, Melamed E. 2003b. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 9(3), 126-132
- [Beal *et al.*, 1993] Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W. 1993. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci*. 16(4), 125-131
- [Beal, 1992] Beal MF. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J*. 6(15), 3338-3344
- [Beal, 1998] Beal MF. 1998. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol*. 44(3 Suppl 1), 110-114
- [Beal, 2003] Beal MF. 2003. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 991, 120-131

-
- [Benabid *et al.*, 1991] Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Perret JE, de Rougemont J. 1991. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet*. Feb 337(8738), 403-406
- [Berg *et al.*, 2003] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2003. *Biochemie*. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag
- [Betarbet *et al.*, 2002] Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. 2002. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 24(4), 308-318
- [Birkmayer und Hornykiewicz, 1961] Birkmayer W, Hornykiewicz O. 1961. The effect of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (= DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Wien Klin Wochenschr*. 113(22), 851-854
- [Birkmayer *et al.*, 1985] Birkmayer W, Knoll J, Riederer P, Youdim MB, Hars V, Marton J. 1985. Increased life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar treatment in Parkinson's disease: a longterm study. *J Neural Transm*. 64(2), 113-127
- [Bittar *et al.*, 1996] Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. 1996. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 16(6), 1079-1089
- [Bjorklund und Lindvall, 1975] Bjorklund A, Lindvall O. 1975. Dopamine in dendrites of substantia nigra suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res*. 83(3), 531- 537
- [Bjorklund, 1999] Bjorklund A. 1999. The use of neural stem cells for gene therapy in the central nervous system. *J Gene Med*. 1, 223-226
- [Bjorklund, 2000] Bjorklund A. 2000. Stammzelltherapie. *EuroBrain Bd*. 2(3), 5-6
- [Blandini und Greenamyre, 1998] Blandini F, Greenamyre JT. 1998. Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Fundam Clin Pharmacol*. 12(1), 4-12
- [Bottenstein und Sato, 1979] Bottenstein JE, Sato GH. 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(1), 514-517
- [Bouvier und Mytilineou, 1995] Bouvier MM, Mytilineou C. 1995. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors *in vitro*. *J Neurosci*. 15, 7141-7149
- [Boveris und Chance, 1973] Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 707-716
- [Bowling und Beal, 1995] Bowling AC, Beal MF. 1995. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci*. 56(14), 1151-1171

-
- [Braak *et al.*, 1998] Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H, Braak E. 1998. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Brain Res.* 117, 267-285
- [Branton und Clark, 1999] Branton RL, Clarke DJ. 1999. Apoptosis in primary cultures of E14 rat ventral mesencephala: time course of dopaminergic cell death and implications for neural transplantation. *Exp Neurol.* 160, 88-98
- [Bredesen, 1995] Bredesen DE. 1995. Neuronal apoptosis. *Ann. Neurol.* 38, 839-851
- [Brewer und Cotman, 1989] Brewer GJ, Cotman CW. 1989. Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res.* 494(1), 65-74
- [Brewer, 1995] Brewer GJ. 1995. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res.* 42(5), 674-683
- [Bronstein *et al.*, 1995] Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, Mullis Sawin SB, Chan J, Wu GC, Hudson PM, Kong LY, Hong JS, McMillian MK. 1995. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* 704, 112-116
- [Burke *et al.*, 1998] Burke RE, Antonelli M, Sulzer D. 1998. Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture. *J Neurochem.* 71(2), 517-525
- [Bywood und Johnson, 2000] Bywood PT, Johnson SM. 2000. Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp Neurol.* 161, 306-316
- [Calne, 1993] Calne DB. 1993. Treatment of Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 329(14), 1021-1027
- [Cameron *et al.*, 1998] Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol.* 36(2), 287-306
- [Casper *et al.*, 1991] Casper D, Mytilineou C, Blum M. 1991. EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *J Neurosci Res.* 30(2), 372-381
- [Chan *et al.*, 1991] Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. 1991. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem.* 57(1), 348-351
- [Chan *et al.*, 1992] Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. 1992. MPTP-induced ATP loss in mouse brain. *Ann N Y Acad Sci.* 648, 306-308

-
- [Chan, 1993] Chan AC. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol.* 71(9), 725-731
- [Chatterjee *et al.*, 1975] Chatterjee IB, Majunder AL, Nandi BK, Subramanian N. 1975. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 258, 24-47
- [Checkoway und Nelson, 1999] Checkoway H, Nelson LM. 1999. Epidemiologic approaches to the study of Parkinson's disease etiology. *Epidemiology.* 10(3), 327-336
- [Clarkson, 2001] Clarkson ED. 2001. Fetal tissue transplantation for patients with Parkinson's disease: a database of published clinical results. *Drugs Aging.* 18(10), 773-785
- [Cohen, 1983] Cohen G. 1983. The pathobiology of Parkinson's disease: biochemical aspects of dopamine neuron senescence. *J Neural Transm Suppl.* 19, 89-103
- [Cohen, 1993] Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunol Today.* 14(3), 126-130
- [Colton *et al.*, 1995] Colton CA, Pagan F, Snell J, Colton JS, Cummins A, Gilbert DL. 1995. Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. *Exp Neurol.* 132, 54-61
- [Compton, 1992] Compton MM. 1992. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.* 11(2), 105-119
- [Costa *et al.*, 1972] Costa E, Groppetti A, Naimzada MK. 1972. Effects of amphetamine on the turnover rate of brain catecholamines and motor activity. *Br J Pharmacol.* 44(4), 742-751
- [Coyle und Puttfarcken, 1999] Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134), 689-695
- [Davies, 1995] Davies KJ. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 61, 1-31
- [Davies, 2000a] Davies KJ. 2000a. An overview of oxidative stress. *IUBMB Life.* 50(4-5), 241-244
- [Davies, 2000b] Davies KJ. 2000b. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* 50(4-5), 279-289
- [De La Cruz *et al.*, 1996a] De la Cruz CP, Revilla E, Steffen V, Rodriguez-Gomez JA, Cano J, Machado A. 1996a. Protection of the aged substantia nigra of the rat against oxidative damage by (-)-deprenyl. *Br J Pharmacol.* 117(8), 1756-1760
- [De La Cruz *et al.*, 1996b] De La Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. 1996b. Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radic Biol Med.* 20(1), 53-61

- [Deacon *et al.*, 1997] Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O. 1997. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med.* 3(3), 350-353
- [Dean *et al.*, 2003] Dean JB, Mulkey DK, Garcia AJ 3rd, Putnam RW, Henderson RA 3rd. 2003. Neuronal sensitivity to Hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J appl Physiol.* 95, 883-909
- [Deitmer, 2000] Deitmer JW. 2000. Glial strategy for metabolic shuttling and neuronal function. *Bioessays.* 22(8), 747-752
- [Deitmer, 2001] Deitmer JW. 2001. Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol.* 129(1-2), 71-81
- [Djaldetti und Melamed, 2001] Djaldetti R, Melamed E. 2001. New therapies for Parkinson's disease. *J Neurol.* 248(5), 357-366
- [Dong *et al.*, 1994] Dong JF, Detta A, Hitchcock ER. 1994. Enhanced in vitro survival and growth of foetal human mesencephalic dopaminergic neurones on laminin and collagen, implications for cell banking *Neurosci Lett.* 178(1), 27-31
- [Dringen *et al.*, 1993a] Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B. 1993a. Glycogen in astrocytes, possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623(2), 208-214
- [Dringen *et al.*, 1993b] Dringen R, Wiesinger H, Hamprecht B. 1993b. Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. *Neurosci Lett.* 163(1), 5-7
- [Dunnett und Bjorklund, 1999] Dunnett SB, Bjorklund A. 1999. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature.* 399(6738 Suppl), A32-39
- [Earnshaw, 1995] Earnshaw WC. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 7(3), 337-343
- [Ehringer und Hornykiewicz, 1960] Ehringer H und Hornykiewicz O. 1960. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klein Wochenschr.* 38, 1236-1239
- [Eidelberg und Edwards, 2000] Eidelberg D, Edwards C. 2000. Functional brain imaging of movement disorders. *Neurol Res.* 22(3), 305-312
- [Fahn und Cohen, 1992] Fahn S, Cohen G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 32(6), 804-812

- [Fawcett *et al.*, 1995] Fawcett JW, Barker RA, Dunnett SB. 1995. Dopaminergic neuronal survival and the effects of bFGF in explant, three dimensional and monolayer cultures of embryonic rat ventral mesencephalon. *Exp Brain Res.* 106(2), 275-82
- [Fearnley und Less, 1991] Fearnley JM, Lees AJ. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 114 (Pt 5), 2283-2301
- [Ferrari *et al.*, 1989] Ferrari G, Minozzi MC, Toffano G, Leon A, Skaper SD. 1989. Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Dev Biol.* 133(1), 140-147
- [Foley und Riederer, 1999] Foley P, Riederer P. 1999. Pathogenesis and preclinical course of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 56, 31-74
- [Freed *et al.*, 2001] Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 344(10), 710-719
- [Fricker *et al.*, 1997] Fricker RA, Torres EM, Dunnett SB. 1997. The effects of donor stage on the survival and function of embryonic striatal grafts in the adult rat brain. I. Morphological characteristics. *Neuroscience.* 79(3), 695-710
- [Gage, 2000] Gage FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science.* 287(5457), 1433-1438
- [Gai *et al.*, 1995] Gai WP, Blessing WW, Blumbergs PC. 1995. Ubiquitin-positive degenerating neurites in the brainstem in Parkinson's disease. *Brain.* 118(Pt 6), 1447-1459
- [Gavrieli *et al.*, 1992] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119(3), 493-501
- [Gilgun-Sherki *et al.*, 2001] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 40(8), 959-975
- [Goda *et al.*, 1997] Goda J, O'Hara JA, Liu KJ, Rhodes ES, Dunn JF, Swartz HJ. 1997. Comparisons of measurements of pO₂ in tissue in vivo by EPR oximetry and microelectrodes. *Adv Exp Med Biol.* 411, 543-549
- [Godlewski *et al.*, 1997] Godlewski G, Gaubert-Cristol R, Rouy S, Prudhomme M. 1997. Liver development in the rat during the embryonic period (Carnegie stages 15-23). *Acta Anat (Basel).* 160(3), 172-178
- [Graham, 1978] Graham DG. 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.* 14(4), 633-643

-
- [Greenamyre und Porter, 1994]** Greenamyre JT, Porter RH. 1994. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*. 44(11 Suppl 8), 7-13
- [Gross *et al.*, 2000]** Gross J, Leclerc N, Heldt J, Müller I, Kietzmann T, Andreeva N. 2000. Differential effects of hypoxia on untreated and NGF treated PC12 cells. *Life Sci*. 67, 2595-2603
- [Halfter *et al.*, 1998a]** Halfter H, Kremerskothen J, Weber J, Hacker-Klöm U, Barnekow A, Ringelstein EB, Stogbauer F. 1998a. Growth inhibition of newly established human glioma cell lines by leukaemia inhibitory factor. *J Neurooncol*. 39(1), 1-18
- [Halfter *et al.*, 1998b]** Halfter H, Lotfi R, Westermann R, Young P, Ringelstein EB, Stogbauer FT. 1998b. Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors*. 15(2), 135-147
- [Halliwell, 1989]** Halliwell B. 1989 Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand Suppl*. 126, 23-33
- [Halliwell, 1992]** Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 59(5), 1609-1623
- [Halliwell, 1996]** Halliwell B. 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res*. 25(5), 439-454
- [Hartley *et al.*, 1994]** Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH. 1994. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*. 63(5), 1987-1990
- [Hartmann *et al.*, 2000]** Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. 2000. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(6), 2875-2880
- [Hauser *et al.*, 1999]** Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH, Olanow CW. 1999. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 56(2), 179-187
- [Hertz *et al.*, 1992]** Hertz L, Peng L. 1992. Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Can J Physiol Pharmacol*. 70 Suppl, S145-157
- [Hertz *et al.*, 1999]** Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*. 57(4):417-428

- [Hertz und Schousboe, 1988] Hertz L, Schousboe A. 1988. Metabolism of glutamate and glutamine in neurons and astrocytes in primary cultures. Glutamine and Glutamate in mammals. Vol. 2 Edited by E. Kuamme. CRC Press, Boca Raton, Fla. 39-55
- [Hertz und Schousboe, 1986] Hertz L, Schousboe A. 1986. Role of astrocytes in compartmentation of amino acid and energy metabolism. Astrocytes. Vol. 2 Edited by S. Federoff and A. Vernadakis. Academic Press, New York. 179-208
- [Hirsch *et al.*, 1997] Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. 1997. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. 15(13), 1573-1581
- [Hockenbery, 1995] Hockenbery D. 1995. Defining apoptosis. *Am J Pathol*. 146(1), 16-19
- [Hoyt *et al.*, 1997] Hoyt KR, Gallagher AJ, Hastings TG, Reynolds IJ. 1997. Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem Res*. 22(3), 333-340
- [Iacono *et al.*, 1995] Iacono RP, Shima F, Lonser RR, Kuniyoshi S, Maeda G, Yamada S. 1995. The results, indications, and physiology of posteroventral pallidotomy for patients with Parkinson's disease. *Neurosurgery*. 36(6), 1118-1127
- [Isacson und Breakefield, 1997] Isacson O, Breakefield XO. 1997. Benefits and risks of hosting animal cells in the human brain. *Nat Med*. 3(9), 964-969
- [Isacson, 2002] Isacson O. 2002. Models of repair mechanismus for future treatment modalities of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*. 57(6), 839-846
- [Itho *et al.*, 2001] Itoh K, Suzuki K, Bise K, Itoh H, Mehraein P, Weis S. 2001. Apoptosis in the basal ganglia of the developing human nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*. 101(2), 92-100
- [Jackson und Kelly, 1983] Jackson EA, Kelly PH. 1983. Role of nigral dopamine in amphetamine-induced locomotor activity. *Brain Res*. 278(1-2), 366-369
- [Jankovic, 1999] Jankovic J. 1999. New and emerging therapies for Parkinson disease. *Arch Neurol*. 56(7), 785-790
- [Janzer, 1987] Janzer RC, Raff MC. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 325(6101), 253-257
- [Javitch *et al.*, 1985] Javitch JA, Damat RJ, Strittmatter SM, Synder SH. 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82, 2173-2177
- [Jenner und Olanow, 1996] Jenner P, Olanow CW. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 47(6 Suppl 3), 161-170

- [Jenner, 1998] Jenner P. 1998. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 13(1), 24-34
- [Jenner, 2003] Jenner P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 53 Suppl 3, 26-38
- [Jenner und Brin, 1998] Jenner PG, Brin MF. 1998. Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. *Neurology*. 50(6 Suppl 6), 39-48
- [Jeon *et al.*, 1999] Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, Stefanis L, Burke RE. 1999. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem*. 73(1), 322-333
- [Jones, 1985] Jones DP. 1985. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: *Oxidative Stress* (Sies H. Eds.) Academic Press London. 151-195
- [Junqueira *et al.*, 1996] Junqueira LC, Carneiro J, übersetzt, überarbeitet und ergänzt durch Schiebeler TH. 1996. *Histologie*. Berlin-Heidelberg. Springer Verlag
- [Kalir und Mytilineou, 1991] Kalir HH, Mytilineou C. 1991. Ascorbic acid in mesencephalic cultures: effects on dopaminergic neuron development. *J Neurochem*. 57(2), 458-464
- [Kandel *et al.*, 1996] Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 1996. *Neurowissenschaften - Eine Einführung*. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag
- [Kannan und Jain, 2000] Kannan K, Jain SK. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 7(3), 153-163
- [Karoum *et al.*, 1993] Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF, Wyatt RJ. 1993. Absence of 6-hydroxyl-dopamine in the rat brain after treatment with stimulants and other dopaminergic agents: a mass fragmentographic study. *J Neurochem*. 61(4), 1369-1375
- [Kesel *et al.*, 1999] Kesel AB, Junge MM, Nachtigall W. 1999. *Einführung in die angewandte Statistik für Biowissenschaftler*. Birkhäuser, Basel
- [Knüsel *et al.*, 1990] Knüsel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F. 1990. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci*. 10(2), 558-570
- [Koolman und Röhm, 1998] Koolman J, Röhm KH. 1998. *Taschenatlas der Biochemie*. Stuttgart. Georg Thieme Verlag
- [Kordower *et al.*, 1998] Kordower JH, Freeman TB, Chen EY, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Snow B, Olanow CW. 1998. Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 13(3), 383-393

- [Kumar *et al.*, 1998] Kumar GK, Overholt JL, Bright GR, Hui KY, Lu H, Gratzl M, Prabhakar NR. 1998. Release of dopamine and norepinephrine by hypoxia from PC-12 cells. *Am J Physiol.* 274(6 Pt 1), 1592-1600
- [Kuo *et al.*, 2000] Kuo JS, Cheng FC, Shen CC, Ou HC, Wu TF, Huang HM. 2000. Differential alteration of catecholamine release during chemical hypoxia is correlated with cell toxicity and is blocked by protein kinase C inhibitors in PC12 cells. *J Cell Biochem.* 79(2), 191-201
- [Kure *et al.*, 1991] Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T, Tada K, Narisawa K. 1991. Glutamate triggers internucleosomal NA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 179(1), 39-45
- [Lang und Lozano, 1998] Lang AE, Lozano AM. 1998. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med.* 339(16), 1130-1143
- [Langston *et al.*, 1984] Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1984. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett.* 48(1), 87-92
- [Larkin, 1999] Larkin M. 1999. Parkinson's disease research moves on briskly. *Lancet.* 353(9152), 566
- [Lauder und Bloom, 1974] Lauder JM, Bloom FE. 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol.* 155(4), 469-481
- [Lee *et al.*, 2000] Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 18(6), 675-679
- [Lièvre *et al.*, 2000] Lièvre V, Becuwe P, Bianchi A, Koziel V, Franck P, Schroeder H, Nabet P, Dauce M, Daval JL. 2000. Free radical production and changes in superoxide dismutase associated with hypoxia/ reoxygenation-induced apoptosis of embryonic rat forebrain neurons in culture. *Free Radical Biology & Medicine.* 29(12), 1291-1301
- [Lin *et al.*, 1993] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 260(5111), 1130-1132
- [Lindvall und Hagell, 2001] Lindvall O, Hagell P. 2001. Cell therapy and transplantation in Parkinson's disease. *Clin Chem Lab Med.* 39(4), 356-361
- [Lindvall, 1994] Lindvall O. 1994. Neural transplantation in Parkinson's disease. In: *Functional Neural Transplantation, Advances in Neuroscience*, 2. Hrsg.: Dunnett SB, Bjorklund A. New York: Raven Press: 103-108

- [Lindvall, 1997] Lindvall O. 1997. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport*. 8(14), iii-x
- [Lindvall, 1998] Lindvall O. 1998. Update on fetal transplantation: the Swedish experience. *Mov Disord*. 13 Suppl 1, 83-87
- [Lindvall, 2000] Lindvall O. 2000. Neural transplantation in Parkinson's disease. *Novartis Found Symp*. 231, 110-28, 145-147
- [Lindvall, 2001] Lindvall O. 2001. Parkinson disease. Stem cell transplantation. *Lancet*. 358 Suppl, 48
- [Lindvall, 2003] Lindvall O. 2003. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res*. 47(4), 279-287
- [Ling *et al.*, 1998] Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. 1998. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol*. 149(2), 411-423
- [Linnemann und Kühl, 2002] Linnemann M, Kühl M. 2002. *Biochemie für Mediziner*. Berlin-Heidelberg. Springer Verlag
- [Liu *et al.*, 1997] Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 89(2), 175-184
- [Löffler und Petrides, 1997] Löffler G, Petrides PE. 1997. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin-Heidelberg. Springer Verlag
- [Löscher *et al.*, 1998] Löscher W, Ebert U, Lehmann H, Rosenthal C, Nikkhah G. 1998. Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra. *J Neurosci Res*. 51(2), 196-209
- [Löschmann und Schulz, 1997] Löschmann PA, Schulz JB. 1997. Degenerative Erkrankungen der Basalganglien. In: *Klinische Neurobiologie*, Herdegen T, Tölle TR, Bähr M (eds). Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag
- [Marek *et al.*, 1996] Marek KL, Seibyl JP, Zoghbi SS, Zea-Ponce Y, Baldwin RM, Fussell B, Charney DS, van Dyck C, Hoffer PB, Innis RP. 1996. [¹²³I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease. *Neurology*. 46(1), 231-237
- [Marsden, 1982] Marsden CD. 1982. Basal ganglia disease. *Lancet*. 2(8308), 1141-1147
- [Marsden, 1990] Marsden CD. 1990. Parkinson's disease. *Lancet*. 335(8695), 948-952
- [Martin, 2001] Martin LJ. 2001. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int J Mol Med*. 7(5), 455-478

- [Masserano *et al.*, 2000] Masserano JM, Baker I, Venable D, Gong L, Zullo SJ, Merrill CR, Wyatt RJ. 2000. Dopamine induces cell death, lipid peroxidation and DNA base damage in a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Neurotox Res.* 1(3), 171-179
- [Meldrum und Garthwait, 1990] Meldrum B, Garthwaite J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 11(9), 379-387
- [Mezey *et al.*, 2000] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 290(5497), 1779-1782
- [Millhorn *et al.*, 1997] Millhorn DE, Raymond R, Conforti L, Zhu W, Breitner Johnson D, Filisko T, Genter MB, Kobayashi S, Peng M. 1997. Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia. *Kidney Int.* 67, 443-462
- [Mizuno *et al.*, 1998] Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T. 1998. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44(3 Suppl 1), 99-109
- [Mogi und Nagatsu, 1999] Mogi M, Nagatsu T. 1999. Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 80, 135-139
- [Müller *et al.*, 1999] Müller T, Eising E, Kuhn W, Buttner T, Coenen HH, Przuntek H. 1999. Delayed motor response correlates with striatal degeneration in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 100(4), 227-230
- [Nagatsu *et al.*, 1964] Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. 1964. Tyrosine Hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 239, 2910-2917
- [Nakao *et al.*, 1997] Nakao N, Nakai K, Itakura T. 1997. Metabolic inhibition enhances selective toxicity of L-DOPA toward mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Brain Res.* 777(1-2), 202-209
- [Nakashima *et al.*, 1970] Nakashima Y, Suzue R, Sanada H, Kawada S. 1970. Effect of ascorbic acid on hydroxylase activity. *J Vitaminol.* 16, 276-280
- [Nicklas *et al.*, 1985] Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36(26), 2503-2508
- [Nikkhah *et al.*, 1994a] Nikkhah G, Cunningham MG, Jodicke A, Knappe U, Bjorklund A. 1994a. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 633(1-2), 133-143

- [Nikkhah *et al.*, 1994b] Nikkhah G, Olsson M, Eberhard J, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A. 1994b. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology. *Neuroscience*. 63(1), 57-72
- [Nikkhah *et al.*, 1994c] Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A. 1994c. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci*. 14(6), 3449-3461
- [Nikkhah und Brandis, 1995] Nikkhah G, Brandis A. 1995. Neurotransplantation in Parkinson disease: experimental and clinical results of functional reconstruction of the dopaminergic system. *Zentralbl Neurochir*. 56(4), 153-160
- [Nikkhah, 2001] Nikkhah G. 2001. Neural Transplantation therapy for Parkinson's disease: potential and pitfall. *Brain Res Bull*. 56, 509
- [O'Malley *et al.*, 1991] O'Malley EK, Black IB, Dreyfus CF. 1991. Local Support Cells Promote Survival of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons in Culture. *Exp Neurol*. 112, 40-48
- [O'Malley *et al.*, 1992] O'Malley EK, Sieber BA, Black IB, Dreyfus CF. 1992. Mesencephalic typ I astrocytes mediate the survival of substantia nigra dopaminergic neurons in culture. *Brain Research*. 582, 65-70
- [Olanow *et al.*, 2001] Olanow CW, Freeman T, Kordower J. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 345, 146-147
- [Olanow, 1990] Olanow CW. 1990. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*. 40(Suppl 3), 32-39
- [Olanow und Nicotera, 1994] Orrenius S, Nicotera P. 1994. The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl*. 43, 1-11
- [Ostergaard *et al.*, 1996] Ostergaard K, Jones SA, Hyman C, Zimmer J. 1996. Effects of donor age and brain-derived neurotrophic factor on the survival of dopaminergic neurons and axonal growth in postnatal rat nigrostriatal cocultures. *Exp Neurol*. 142(2), 340-350
- [Owen *et al.*, 1996] Owen AD, Schapira AH, Jenner P, Marsden CD. 1996. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 786, 217-223
- [Padh, 1990] Padh H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Cell Biol*. 68, 1166-1173
- [Payne *et al.*, 1995] Payne CM, Bernstein C, Bernstein H. 1995. Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma*. 19(1-2), 43-93

- [Pedrosa und Soares-da-Silva, 2002] Pedrosa R, Soares-da-Silva P. 2002. Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *Br J Pharmacol.* 137(8), 1305-1313
- [Peng *et al.*, 1994] Peng L, Zhang X, Hertz L. 1994. High extracellular potassium concentrations stimulate oxidative metabolism in a glutamatergic neuronal culture and glycolysis in cultured astrocytes but have no stimulatory effect in a GABAergic neuronal culture. *Brain Res.* 663(1), 168-172
- [Perrier und Studer, 2003] Perrier AL, Studer L. 2003. Making and repairing the mammalian brain-in vitro production of dopaminergic neurons. *Semin Cell Dev Biol.* 14(3), 181-189
- [Pollanen *et al.*, 1993] Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. 1993. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52(3), 183-191
- [Ratan *et al.*, 1994] Ratan RR, Murphy TH, Baraban JM. 1994. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J Neurochem.* 62, 376-379
- [Ray *et al.*, 1993] Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH. 1993. Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(8), 3602-3606
- [Ray *et al.*, 1995] Ray J, Raymon HK, Gage FH. 1995. Generation and culturing of precursor cells and neuroblasts from embryonic and adult central nervous system. *Methods Enzymol.* 254, 20-37
- [Riederer *et al.*, 2000] Riederer P, Sian J, Gerlach M. 2000. Is there neuroprotection in Parkinson syndrome? *J Neurol.* 247 Suppl 4, IV/8-11
- [Rose und Bode, 1993] Rose RC, Bode AM. 1993. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 7(12), 1135-1142
- [Sachs und Jonsson, 1975] Sachs C, Jonsson G. 1975. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol.* 24(1), 1-8
- [Sanchez-Ramos *et al.*, 2000] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 164(2), 247-256
- [Sawada *et al.*, 1998] Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Kimura J, Shimohama S. 1998. Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress. *Ann Neurol.* 44(1), 110-119
- [Schmidt und Thews, 1997] Schmidt RF, Thews G. 1997. *Physiologie des Menschen.* Berlin-Heidelberg. Springer Verlag

- [Schousboe *et al.*, 1997] Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ, Sonnewald U. 1997. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia*. 21(1), 99-105
- [Schreiber und Trojan, 1991] Schreiber M, Trojan S. 1991. Ascorbic acid in the brain. *Physiol Res*. 40(4), 413-418
- [Schumacher *et al.*, 2000] Schumacher JM, Elias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fischman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O. 2000. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*. 54(5), 1042-1050
- [Schurr *et al.*, 1988] Schurr A, West CA, Rigor BM. 1988. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science*. 240(4857), 1326-1328
- [Searle *et al.*, 1982] Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 17 Pt 2, 229-259
- [Shabnam *et al.*, 2003] Shabnam GN, Th C, Kho D, H R, Ce C. 2003. Therapies for depression in Parkinson's disease. *CochraneDatabase Syst Rev*. (3): CD003465
- [Sherer *et al.*, 2001] Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. 2001. Pesticides and Parkinson's Disease. *ScientificWorldJournal*. 1(5), 207-208
- [Specht *et al.*, 1981] Specht LA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. 1981. Fine structure of the nigrostriatal anlage in fetal rat brain by immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase. *Brain Res*. 218(1-2), 49-65
- [Spillantini *et al.*, 1997] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388(6645), 839-840
- [Steinhäuser und Gallo, 1996] Steinhäuser C, Gallo V. 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci*. 19(8), 339-345
- [Studer *et al.*, 1995] Studer L, Spenger C, Seiler RW, Altar CA, Lindsay RM, Hyman C. 1995. Comparison of the effects of the neurotrophins on the morphological structure of dopaminergic neurons in cultures of rat substantia nigra. *Eur J Neurosci*. 7(2), 223-233
- [Studer *et al.*, 1998] Studer L, Tabar V, McKay RD. 1998. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci*. 1(4), 290-295
- [Studer *et al.*, 2000] Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*. 20(19), 7377-7383

- [Svendsen *et al.*, 1995] Svendsen CN, Fawcett JW, Bentlage C, Dunnett SB. 1995. Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Exp Brain Res.* 102(3), 407-414
- [Tepper *et al.*, 1994] Tepper JM, Damlama M, Trent F. 1994. Postnatal changes in the distribution and morphology of rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neuroscience.* 60, 469-477
- [Toma *et al.*, 2001] Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 3(9), 778-784
- [Tsacopoulos und Magistretti, 1996] Tsacopoulos M, Magistretti PJ. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci.* 16(3), 877-885
- [Tulloch, 1997] Tulloch IF. 1997. Pharmacologic profile of ropinirole: a nonergoline dopamine agonist. *Neurology.* 49(1 Suppl 1), 58-62
- [Ungerstedt, 1968] Ungerstedt U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5(1), 107-110
- [Unsicker, 1994] Unsicker K. 1994. Growth factors in Parkinson's disease. *Prog Growth Factor Res.* 5(1), 73-87
- [Wagner *et al.*, 1999] Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, Arenas E. 1999. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol.* 17(7), 653-659
- [Waki *et al.*, 2001] Waki A, Yano R, Yoshimoto M, Sadato N, Yonekura Y, Fujibayashi. 2001. Dynamic changes in glucose metabolism accompanying the expression of the neural phenotyp after differentiation in PC12 cells. *Brain Res.* 894, 88-94
- [Vannucci *et al.*, 1997] Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 21(1), 2-21
- [Wei *et al.*, 2000] Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A. 2000. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta.* 1498(1), 72-79
- [Wenning *et al.*, 1997] Wenning GK, Odin P, Morrish P, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Brown R, Gustavii B, Hagell P, Jahanshahi M, Sawle G, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. 1997. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastratial dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 42(1), 95-107
- [Wiehle, 2002] Wiehle M. 2002. Differenzierung neuronaler Progenitoren aus dem ventralen Mesenzephalon der embryonalen Ratte. Diplomarbeit. Technische Universität Berlin

- [Winkler *et al.*, 1996] Winkler C, Sauer H, Lee CS, Bjorklund A. 1996. Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 16(22), 7206-7215
- [Wyllie *et al.*, 1992] Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. 1992. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol.* 4(6), 389-397
- [Yan *et al.*, 2001] Yan J, Studer L, McKay RD. 2001. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem.* 76(1), 307-311
- [Yoritaka *et al.*, 1996] Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. 1996. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(7), 2696-2701
- [Zeevalk *et al.*, 1998] Zeevalk GD, Bernard LP, Sinha C, Ehrhart J, Nicklas WJ. 1998. Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. *Dev Neurosci.* 20(4-5), 444-453
- [Zeevalk *et al.*, 2000] Zeevalk GD, Bernard LP, Nicklas WJ. 2000. Oxidative stress during energy impairment in mesencephalic cultures is not a downstream consequence of a secondary excitotoxicity. *Neurosci.* 96(2), 309-316
- [Ziv *et al.*, 1994] Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A. 1994. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons-a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 170(1), 136-40
- [Ziv *et al.*, 1998] Ziv I, Melamed E. 1998. Role of Apoptosis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease; A Novel Therapeutic Opportunity? *Movement Disorders.* 13(6), 865-870
- [Zou *et al.*, 1999] Zou L, Jankovic J, Rowe DB, Xie W, Appel SH, Le W. 1999. Neuroprotection by pramipexole against dopamine- and levodopa-induced cytotoxicity. *Life Sci.* 64, 1275-1285

7 Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	GABA	γ -Aminobuttersäure
ATP	Adenosintriphosphat	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor		Dehydrogenase
BDNF	brain derived growth factor	GDNF	glial derived growth factor
bp	Basenpaare	h	Stunden
BrdU	5-Bromdesoxyuridin	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
bzw.	beziehungsweise	HPRT	Hypoxantine-phosphoribosyl-transferase
°C	Grad Celsius	IGF	insulin-like growth factor
Ca	Calcium	K	Kalium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	l	Liter
Cy3	Cyanine-3-Tyramide	m	milli <i>oder</i> Meter
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	M	Molar
DAPI	4'-6-Diamino-2-phenylindole	MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MEM	Minimal Essential Medium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium	min	Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	n	Nano <i>oder</i> Anzahl der Messwerte
DNase	Desoxyribonuklease	N	Normal
dNTP	2'-Desoxy-Ribonukleosid-5'-Triphosphat	Na	Natrium
DPMA	Deutsches Patent- und Markenamt	NFm	Neurofilament (<i>middle chain</i>)
DTT	Dithiotreit	NMDA	N-methyl-D-aspartat
E	Embryonalentwicklungstag	NO	Stickoxyl
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	OH	Hydroxyl
EGF	epidermal growth factor	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
EGTA	Ethylenglykol-bis-aminoethyl-ether-N,N,N,N-tetraessigsäure	PCR	polymerase chain reaction
Fa.	Firma	PEI	Polyetherimid
FCS	Fötales Kälberserum	PFA	Paraformaldehyd
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	PG	Prüfgröße
g	Gramm <i>oder</i> Erdbeschleunigung	pH	Wasserstoffionenkonzentration (-log H ⁺)
		PNS	Peripheres Nervensystem
		PTFE	Polytetrafluorethylen

PET	Positronen-Emissionstomographie	TUNEL	TdT-dependent-dUridintriphosphat-nick end labeling
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)	Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction	U	Einheiten (<i>Units</i>)
s	Sekunde	w/v	Gewichtsteil/Volumenteil
SDS	Sodiumdodecylsulfat	X_i	einzelner Messwert
SEM	mittlerer Fehler der Standardabweichung	\bar{X}	Mittelwert
TH	Tyrosin-Hydroxylase	μ	Mikro <i>oder</i> Mittelwerte einer Grundgesamtheit
Tris	Trishydroxymethylaminomethan	z.B.	zum Beispiel
TuJ1	β -Tubulin III	ZNS	Zentrales Nervensystem